

Über die Wirksamkeit einer durch Einwirkung
von Röntgenstrahlen
hergestellten Pneumokokkenvaccine im
Vergleich zur herkömmlichen Formalinvaccine

Günter Vohl

1964

Aus dem Institut für Tierhygiene der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. A. Meyn

ÜBER DIE WIRKSAMKEIT EINER DURCH EINWIRKUNG VON
RÖNTGENSTRAHLEN HERGESTELLTEN PNEUMOKOKKENVACCINE
IM VERGLEICH ZUR HERKÖMMLICHEN FORMALINVACCINE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Günter Vohl
aus
Stuttgart

München 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. A. Meyn

Referent: Professor Dr. A. Meyn

Tag der Promotion: 24. Februar 1961



UNI-Druck, München 13, Amalienstraße 85

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Literatur	2
A. Bakteriologie der Pneumokokken	2
1.) Künstliche Nährböden	2
2.) Virulenz der Pneumokokken	3
3.) R - S - Formen	3
4.) Chemische Struktur der Pneumokokken	4
5.) Biologische Eigenschaften der Pneumokokken	5
B. Serologie der Pneumokokken	6
1.) Typen	6
2.) Immunisierung mit Pneumokokken	8
3.) Antigene Wirkung avirulenter Pneumokokken	10
4.) Immunisierung mit Pneumokokkenextrakten	11
5.) Abtötung der Pneumokokken durch Formalin	12
6.) Abtötung von Bakterien durch Einwirkung von Röntgenstrahlen	13
III. Eigene Untersuchungen	16
A. Material und Methodik	16
1.) Material	16
2.) Methodik der Vorversuche	16
3.) Aktive Immunisierung von Mäusen	22
4.) Serumschutzversuche	24
B. Untersuchungsergebnisse	27
1.) Ergebnisse der Vorversuche	27
2.) Aktive Immunisierung von Mäusen	36
3.) Serumschutzversuche	40
C. Besprechung der Ergebnisse	42
IV. Zusammenfassung	51
V. Literaturverzeichnis	52
Lebenslauf	59



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555622_0013

I. EINLEITUNG

Die prophylaktische Serumbehandlung der Pneumokokkeninfektion der Kälber hat durch die Möglichkeit einer genauen Typendiagnose zunehmende Bedeutung erlangt. Daher ist die Herstellung eines hochwertigen Pneumokokkenserums von Interesse.

Die zur Immunisierung von Kaninchen benutzten Pneumokokkenkulturen wurden bisher durch Erhitzen oder durch Zusatz von Chemikalien wie Karbolsäure oder Formalin abgetötet.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob Pneumokokkenkulturen, die durch die Einwirkung weicher Röntgenstrahlen abgetötet wurden, zur Vaccine- und Serumherstellung brauchbar sind. Als Vergleich dienten formalinaktivierte Pneumokokkensuspensionen.

II. LITERATUR

A. Bakteriologie der Pneumokokken

Pneumokokken wurden zum ersten Mal von Fränkel (24) und Weichselbaum (67) aus dem Sputum von Menschen, die an kruppöser Pneumonie erkrankt waren, in Reinkultur gezüchtet.

Die Keime wurden zunächst auf Grund ihrer Erscheinungsformen als Diplokokken bezeichnet. Da sie in den meisten Fällen als Erreger von Krankheiten des Respirationsapparates vorkommen, hat sich die Bezeichnung "Pneumococcus" eingebürgert.

Der Pneumococcus gehört zur Familie der Streptococcaceae Genus Streptococcus. Es handelt sich um einen Diplococcus, dessen Glieder eine kerzenflammenähnliche Form aufweisen. Die Spitzen der beiden nebeneinanderliegenden Keime sind meist einander zugekehrt, bei manchen Formen aber auch voneinander abgekehrt. Sie werden von einer Kapsel umschlossen, die im Grampräparat als heller Hof um den grampositiven Keim und mit Hilfe von Differentialdoppelfärbungen (22, 5) zu sehen ist. Im Ausstrich liegen die Diplokokken meist einzeln, oder sie bilden kurze Ketten.

1.) Künstliche Nährböden

Die Pneumokokken gehören zu den kulturell anspruchsvollen Keimen. Sie wachsen zwar auch auf Nährböden einfacherer Zusammensetzung, aber für die Erhaltung ihrer Eigenschaften, vor allem ihrer Virulenz, ist die Beschaffenheit der Nährböden von ausschlaggebender Bedeutung.

In gewöhnlicher Bouillon wachsen die Pneumokokken unter leichter gleichmäßiger Trübung nur spärlich. Wird die Bouillon im Autoklaven sterilisiert und mit Pneumokokken beimpft, so erhält man nach Bebrütung oft gar kein Wachstum oder nur eine ganz minimale Trübung der Bouillon. Optimales Wachstum ist dagegen in einer nicht autoklavierten Bouillon mit 5 - 10 % Serumzusatz festzustellen (Neufeld und Schnitzer (56)). Auf gewöhnlichem Agar bilden die Pneumokokken sehr kleine, nicht zusammenhängende, taupfenartige Kolonien mit dunklerem Zentrum und mit hellerem, glattem Rand. Von den festen Nährböden besonders geeignet ist die Blutagarplatte. Hier zeigen sich die Kulturen der virulenten S-Form als glatte Kolonien mit dunklerem Zentrum, das sich nach 20 - 24ständiger Bebrütung dellenförmig

einzieht. Eine dunkelgrüne Verfärbung um den Rand der Einzelkolonie zeigt Haemolyse an.

Zur Abgrenzung gegenüber *Streptococcus faecalis* und *Streptococcus salivarius* seu *hominis* werden vorteilhaft Blutzuckerplatten nach Hackenthal und Bierkowski (33) benutzt.

2.) Virulenz der Pneumokokken

Die Virulenz der Pneumokokken ist, im Gegensatz zu der Virulenz anderer pathogener Mikroorganismen, außerordentlich labil. Bei der Züchtung auf allen Nährböden muß man auf einen plötzlichen oder allmählichen Virulenzverlust gefaßt sein. Zur Erhaltung einer gleichbleibenden Virulenz wird entweder pneumokokkenhaltiges Material (die Milz einer an Pneumokokkensepsis gestorbenen Maus oder einige Tropfen bewachsener Serumbouillon) im Exsikkator getrocknet; oder die Keime werden im Turnus (Maus-Serumbouillon-Maus-Serumbouillon) gezüchtet. Durch ständige Überimpfung von Tier zu Tier kann die Virulenz der Pneumokokken gesteigert werden. So gelang es schon Menzies (47) im Jahre 1897 durch ständige Übertragung pneumokokkenhaltigen Blutes von Kaninchen zu Kaninchen die Virulenz eines Pneumokokkenstammes so zu steigern, daß nach 125 Passagen 10^{-8} ccm Blut ein Kaninchen innerhalb von 20 Stunden töten konnte. Nach einer Passage war dagegen noch 1 ccm Peritonealexsudat des ersten infizierten Kaninchens notwendig gewesen, um das zweite Tier zu töten.

3.) R - S - Formen

Virulente Pneumokokken zeigen auf der Blutplatte spiegelglatte, tautropfenähnliche Kolonien von etwa 1 mm Durchmesser. Kolonien dieser Art stellen die S-Form dar. Friel (26) und Stryker (61) gelang es unabhängig voneinander, degradierte Varianten durch Züchtung in typenhomologem Serum zu gewinnen. Baurhenn (7) kam zu den gleichen Varianten durch Züchtung von vollvirulenten Pneumokokken in gallehaltigem Medium oder durch Alternlassen einer Blutagarkultur. Derartige Varianten wuchsen auf der Blutplatte in sehr kleinen Kolonien mit rauher Oberfläche (R-Form). Diese R-Form der Pneumokokken ist durch den Verlust der Agglutinabilität, der Virulenz, durch ein reines Bodensatzwachstum in Aszitesbouillon, durch Kolonieform auf der Blutplatte und durch den Verlust des grampositiven Charakters gekennzeichnet.

Pneumokokken der R-Form lassen sich durch einige Tierpassagen unter Wiedererwerb ihrer ursprünglichen Eigenschaften in die S-Form zurückverwandeln. Nach Griffith (32), Felton und Dougherty (20) ist auch in vitro ein Umschlag der R-Form in die S-Form möglich.

Wenn lebende Pneumokokken der R-Form mit abgetöteten Pneumokokken der S-Form eines anderen Typs zusammen Mäusen injiziert werden, so geschieht eine Umwandlung der lebenden R-Keime in den Typ der abgetöteten, zugleich injizierten S-Keime. Wenn z. B. lebende Typ II Pneumokokken der R-Form zusammen mit abgetöteten Typ 8 Pneumokokken der S-Form Mäusen i. p. gespritzt wurden, so lassen sich aus den Organen der infizierten Mäuse Typ 8 Pneumokokken der S-Form züchten.

4.) Chemische Struktur der Pneumokokken

Der Pneumococcus besteht aus einem Körper und einer Kapsel. Körper und Kapsel sind von unterschiedlicher chemischer Struktur.

- a.) Spezifisch für die Pneumokokken aller Typen ist ein wahrscheinlich an Lipide gebundenes Nukleoprotein, mit dem sich durch Immunisierung von Mäusen ein Schutz gegen verschiedene Pneumokokkentypen erzeugen läßt.
- b.) Die Pneumokokken enthalten ein Polysaccharid C, das Phosphor enthält und auch bei anderen Bakterienarten vorkommt.
- c.) Nach Heidelberger, Goebel und Avery (36) lassen sich aus den Pneumokokken Polysaccharide isolieren, die einen für jeden Typ spezifischen Aufbau haben. Diese Polysaccharide wurden SSS genannt (specific soluble substance).

Die SSS wird noch in Verdünnungen von 1 : 3 000 000 präzipitiert. Durch Immunisierung mit der intakten Pneumokokkenzelle läßt sich ein Serum erzeugen, das typenspezifische Antistoffe gegen die SSS des zur Immunisierung verwendeten Typs und artspezifische Antistoffe gegen das Pneumokokkennukleoprotein enthält.

Kapsel und Körper bilden nach Avery und Heidelberger (2) einen Antigenkomplex.

5.) Biologische Eigenschaften der Pneumokokken

a.) Autolyse: Nach Avery und Cullen (3) enthalten Pneumokokken ein proteolytisches, ein lipolytisches, ein kohlehydratspaltendes und ein bakteriolytisches Enzym. Dieses Fermentsystem ist dafür verantwortlich zu machen, daß bei Pneumokokken in künstlichen Nährmedien schon nach 24 Stunden bei 37° C eine charakteristische Autolyse einsetzt.

Die Lyse zeigt sich in dem Verlust der Gramfestigkeit, in der Auflösung des Zellkörpers und im Klarwerden des durch Pneumokokkenwachstum getrübbten flüssigen Nährbodens oder einer Pneumokokkenaufschwemmung. Nach Dubos (19) können mit Hilfe der Enzyme lebender Pneumokokken hitzeabgetötete Pneumokokken aufgelöst werden. Wie aus den Arbeiten von Sturza (61) und Dubos (16) zu entnehmen ist, vernichtet das Gefrierenlassen und Wiederauftauen von Pneumokokken durch einen noch unbekannten Vorgang die Widerstandsfähigkeit, die jeder Pneumococcus der Einwirkung seiner eigenen lösenden Enzyme entgegensetzt.

Die autolytischen Fermente können nach Dubos (17), Neufeld, Etinger-Tulczynska (55) und Goodner, Horsfall und Dubos (27) durch Formalin, Jod oder durch Aufschwemmung von Pneumokokken in einer Flüssigkeit mit saurer Reaktion inaktiviert werden. Die Autolyse bleibt dann aus. Durch Fermentwirkung kann das Kapselantigen, das für die Typenspezifität der Pneumokokken verantwortlich ist, inaktiviert werden, ohne daß jedoch das Kapselpolysaccharid zerstört wird.

Die Inaktivierung des Kapselantigens drückt sich in der Änderung der grampositiven Struktur aus. Der Verlust der grampositiven Struktur der Pneumokokken ist mit dem Verlust der typenspezifischen Antigenität verbunden (Dubos (17)).

b.) Gallelöslichkeit: Pneumokokken werden durch Galle oder gallensaure Salze in kurzer Zeit aufgelöst. Diese Lösung kommt durch Aktivierung der autolytischen Fermente zustande. Die Lösung der Pneumokokken durch Galle oder gallensaure Salze kann nach Neufeld und Etinger-Tulczynska (55) durch die Chemikalien aufgehoben werden, die auch die spontane Autolyse der Pneumokokken verhindern. Die Auflösung der Keime ist an einem Klarwerden der Pneumokokkensuspension, der einige Tropfen einer 10 %igen NatriumdesoxycholatstammLösung zugefügt werden, erkennbar.

c.) Optochinempfindlichkeit: Es gelingt, das Wachstum von Pneumokokken durch einen Zusatz von Azethylhydrocuprein in einer Verdünnung von 1 : 1 000 000 zum Nährboden zu hemmen.

Streptokokken werden dagegen bereits durch eine Verdünnung von 1 : 1 000 - 5 000 nicht mehr beeinflußt.

d.) Spaltungsvermögen: Alle Pneumokokken spalten Glukose, Galaktose, Laktose, Saccharose und Maltose. Arabinose, Xylose, Dulcitol und Sorbit wird nicht gespalten.

Das Verhalten gegenüber Mannit, Salicin und Aeskulin variiert; manche Stämme spalten auch diese Zuckerarten. Inulin wird meist vergoren (Morch - Lund (51)).

B. Serologie der Pneumokokken

1.) Typen

a.) Einteilung:

Die Einteilung der Pneumokokken in serologisch verschiedene Typen wurde von Neufeld und Haendel (54), Dochez (14), Cole (9), Avery (1) und anderen begründet.

Die Typen I, II und III wurden als fixe Typen bezeichnet, während alle übrigen Pneumokokkentypen, die nicht mit den Seren der ersten drei Typen reagierten, unter die Sammelgruppe X oder 4 fielen. Diese Gruppe X wurde dann von Cooper, Edwards und Rosenstein (13) in die Gruppen 4 - 32 aufgeteilt. Kauffmann, Morch und Schmith (40) haben die serologische Differenzierung fortgesetzt. Heute sind 77 Pneumokokkentypen bekannt. Durch gekreuzte Absorption zeigte sich, daß manche Typen eine Antigengemeinschaft haben (Kaufmann, Morch und Schmith (40)). Solche Antigengemeinschaften wurden in Gruppen zusammengefaßt. Die Gruppe 7 besteht z. B. aus 4 Untertypen: 7, 7a, 7b, 7c, die serologisch mit gekreuzter Absorption festgelegt werden können.

b.) Diagnostik:

Die Typendiagnose geschieht durch Langsamagglutination mit typenspezifischen Seren, oder, schneller und zuverlässiger, mit Hilfe der Neufeld'schen Kapselquellungsreaktion (53). Diese Kapselquellungsreaktion kommt durch eine An-

tigen-Antikörperbindung zwischen dem spezifischen Polysaccharid der Kapsel und den spezifischen Antikörpern des typenhomologen Serums zustande. Sie wird dadurch sichtbar, daß die Pneumokokkenkapsel bei Zugabe des typenhomologen Serums um das 2 - 3fache ihrer ursprünglichen Größe anschwillt.

c.) Vorkommen der Pneumokokkentypen

Mensch: G u n d e l (28) zeigte in seiner Arbeit über das Vorkommen von Pneumokokken in den oberen Atemwegen gesunder Personen, daß die Gruppe X in 60 %, die Typen I in 0,8 %, II in 0,4 % und III in 6,7 % der untersuchten Fälle nachweisbar waren. Die Tatsache, daß bei den verschiedenen Untersuchungszeiten verschiedene Typen festgestellt werden konnten, zeigt, daß der Mensch verhältnismäßig häufig einer Pneumokokkeninfektion ausgesetzt ist.

Die Pneumokokken der Gruppe X scheinen für den Menschen wenig virulent zu sein, da sie höchstens nach Resistenzminderung des Makroorganismus eine Bronchitis oder eine Bronchopneumonie hervorzurufen imstande sind (G u n d e l und S c h w a r z (29), G u n d e l und W a s u (31)).

Bei neugeborenen Kindern sind die oberen Atemwege und die Mundhöhle weitgehend als steril anzusehen. Am 2. - 3. Tag post partum ist häufig derselbe Pneumokokkentyp wie bei der Mutter nachweisbar (G u n d e l und S c h w a r z (30)).

Kalb: Schon 1910 isolierte K r a u t s t r u n k (44) bei 9 von 73 untersuchten Kälbern Diplokokken aus dem Blut und aus sämtlichen Organen in Reinkultur, in 16 Fällen auch als Mischinfektion mit Colibakterien.

C h r i s t i a n s e n (12) erkannte, daß die von Kälbern isolierten Pneumokokken nicht von denen des Menschen zu trennen sind. Auch F e y (21) sprach die Diplokokken des Kalbes als echte Pneumokokken an.

Bakteriologen der nordischen Staaten begannen als erste, die Tierstämme zu typisieren. K ä m p e (41) konnte von 339 Kälberstämmen mit einer Ausnahme alle serologisch festlegen. Auch R ö m e r (58) führte eine Typenbestimmung der Pneumokokken, die bei Kälbern vorkommen, durch. H a m m e r (34) stellte 1951 - 1954 in Südbaden bei Kälbern 1 200 Pneumokokkeninfektionen fest, wobei 1088 isolierte Pneumokokkenstämme serologisch bestimmt werden konnten. Es dominierten die Typen 4 - 46, während die Typen I, II und III nur in 1,1 % aller Fälle nachweisbar waren. Durch Untersuchungen des Pflegepersonals infektionsgefährdeter Bestände wurden aus deren Atemschleimhaut der dem Infektionstyp bei Kälbern entsprechende Typ isoliert. Die Pneumokokkeninfek-

tion des Kalbes kann demnach als echte Zoonose betrachtet werden.

Untersuchungen bei gesunden Kälbern ergaben analoge Verhältnisse wie beim Menschen. In 18,8 % der untersuchten Fälle wurden positive Pneumokokkenbefunde erhoben, wobei die Typen I, II und III aus dem verfügbaren Material nicht isoliert werden konnten (Hammer (35)).

2.) Immunisierung mit Pneumokokken

Schon im Jahre 1884 gelang es Fränkel (24), mit geringen Dosen von lebenden Pneumokokken Kaninchen gegen eine tödliche Dosis zu immunisieren.

Foa, Bordini und Uffreduzzi (23) konnten Kaninchen durch Pneumokokkenkulturen, deren Virulenz während der Immunisierung gesteigert wurde, gegen Diplokokkeninfektionen widerstandsfähig machen.

Biondi (8) benutzte zur Immunisierung 1 - 2 Wochen alte Kulturen.

1887/88 versuchte Netter (52) durch folgende Verfahren Immunität gegen Pneumokokkeninfektionen zu erzeugen:

- a.) Er verimpfte Stücke getrockneter Milz von Tieren, die an Pneumokokkensepsis gestorben waren.
- b.) Er versuchte durch Sputum von Personen, die eine Pneumonie überstanden hatten, Immunität hervorzurufen.
- c.) Er verimpfte postpneumonische Pleuraexsudate.

Auch G. und F. Klemperer (43) wandten 1891 mehrere Verfahren zur Immunisierung gegen Pneumokokkeninfektionen an. Als Antigen diente:

- a.) Speichel pneumoniekranke Personen nach der Krisis.
- b.) Vorkritisches Sputum, das durch Erwärmen seiner Giftigkeit beraubt war.
- c.) Metapneumonisches eitriges Exsudat, das sich als bakterienfrei erwies.
- d.) Abschwemmung einer Agarkultur mit Glyzerin, die 1 - 2 Stunden auf $60 - 62^{\circ}\text{C}$ erhitzt und dann filtriert worden war.
- e.) Bouillonkulturen, die 1 - 2 Stunden auf 60°C erhitzt oder 1 - 2 Tage bei $40 - 42^{\circ}\text{C}$ gehalten wurden.

Es gelang mit allen Methoden, eine Immunität gegen Pneumokokkeninfektionen zu erzeugen. Die letztere Methode erwies sich jedoch als die beste.

G. und F. Klemperer (43) bewiesen durch ihre Versuche, daß jede Nährlösung, in der Pneumokokken gewachsen sind, imstande ist, auch nach Ausschaltung der Kokken selbst, einen gewissen Schutz gegen Pneumokokkeninfektionen hervorzurufen. Die immunisierende Wirkung wird beschleunigt und erhöht, wenn die kokkenhaltige oder kokkenfrei gemachte Nährlösung einige Zeit höherer Temperatur ausgesetzt wird.

Neufeld (53) empfahl, die Immunisierung mit Pneumokokken derart durchzuführen, daß zuerst mit abgetöteten Keimen eine Grundimmunität hervorzurufen wird, die sich dann durch Verabreichung von Lebend-Kulturen in steigenden Dosen rasch steigern läßt. Es ist vorteilhaft, zur Immunisierung nur die Pneumokokkenleiber zu verwenden, da bei Injektion von Bouillonkultur bald nicht mehr die Virulenz der Keime, sondern die im Bouillonfiltrat nachzuweisenden Giftstoffe gefährlich werden.

Nach Neufeld (53) ist die Höhe des Agglutiningehaltes eines durch Immunisierung mit Pneumokokken gewonnenen Serums nicht vom Immunitätsgrad des Tieres, sondern von der Reaktion, die das Tier bei der letzten Injektion mitgemacht hat, abhängig. Der Agglutiningehalt ist um so höher, je stärker die Reaktion war, d.h. je stärker der Organismus des Tieres durch die Immunisierung in Anspruch genommen wurde. Der Agglutiningehalt eines Pneumokokkenserums blieb nur etwa 10 - 14 Tage unverändert, dann trat eine so schnelle Verminderung des Agglutinationsvermögens ein, daß nach wenigen Wochen nichts mehr davon nachzuweisen war. Die immunisierende Wirkung eines Pneumokokkenserums ist nach Neufeld nicht mit dem Kapselquellungsvermögen des Serums in Verbindung zu bringen, da es auch kräftig immunisierende Seren gibt, die die Pneumokokkenkapsel überhaupt nicht quellen lassen.

Levy und Aoki (46) benutzten als Impfstoff eine Eierbouillonkultur, die mit einem Zusatz von 0,5 % Karbolsäure 4 - 5 Stunden bei 37° C gehalten wurde. Schon eine Stunde nach der Bebrütung der Pneumokokken mit Karbolzusatz konnten keine lebenden Keime mehr nachgewiesen werden. Kaninchen vertrugen große Mengen dieses Impfstoffes. Die Verfasser spritzten 3 Tage lang 45 - 50 ccm und konnten so die Tiere gegen die 2 000 000fach tödliche Dosis schützen.

Cole und Moore (10) und Yoshioka (68) erhielten Seren von hohem Agglutiningehalt und gutem Schutzwert, indem sie 18 - 20stündige Serum-bouillonkulturen auszentrifugierten und die Keime durch Erwärmung abtöteten. Cole und Moore erhitzten das Zentrifugat aus Serumbouillonkultu-

ren 45 Min. auf 56°C und resuspendierten die abgetöteten Keime in physiologischer Kochsalzlösung bis zum Ursprungsvolumen.

Yoshioka resuspendierte das Zentrifugat aus 100 ccm Serumbouillonkultur in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung und erhitzte die Suspension 20 Min. auf 60°C .

Die Impfstoffe mußten jedoch alle 8 Tage frisch hergestellt werden, da sie sich, auch nach Aufbewahrung im Eisschrank, nicht in ihrer ursprünglichen Form erhielten.

Killian (42) und vor allem Tani (63) zeigten durch ihre Untersuchungen, daß ein Pneumokokkenimpfstoff, der bei verhältnismäßig niederen Temperaturen schonend abgetötet wurde, von schlechterer Qualität war, als wenn die Keime bei hohen Temperaturen abgetötet wurden. Killian kochte Pneumokokkensuspensionen 10 Min. im Dampftopf und erzielte so einen hochwertigeren Impfstoff, als wenn er die Keime bei niedrigeren Temperaturen abtötete.

Tani untersuchte Pneumokokkenvakzinen, die bei verschiedenen Temperaturen abgetötet worden waren. Er stellte fest, daß ein Impfstoff, der 2 1/2 Stunden bei 45°C nur unvollständig abgetötet worden war, eine schlechte immunisierende Wirkung hatte. Ein anderer Impfstoff, der ebenfalls 2 1/2 Stunden auf 45°C erhitzt, dabei aber vollständig abgetötet und nachträglich noch eine halbe Stunde auf 56°C erhitzt worden war, hatte dagegen ein kräftiges Immunisierungsvermögen. Pneumokokken, die 10 Min. bis 4 Stunden bei 100°C erhitzt worden waren, ergaben stets einen guten Impfstoff.

3.) Antigene Wirkung avirulenter Pneumokokken

Wie aus weiteren Untersuchungen von Tani (63) hervorgeht, lassen sich nach längerer Züchtung typischer Pneumokokkenstämme bei 39°C verschiedenartige Veränderungen der Keime beobachten: Sie werden gramlabil, sie verändern ihre Gestalt, verlieren ihre Kapsel und werden avirulent. Derart avirulent gewordene Keime ergaben meist einen schlechten Immunisierungserfolg.

Auch Yoshioka (68), Killian (42), Meyer und Sukneff (48) und andere beschrieben, daß mit schwach - oder avirulenten Pneumokokken meist nur eine geringe oder gar keine Schutzwirkung zu erreichen ist. Nach Tani kommen jedoch Ausnahmen vor.

Nach Yoshioka (68), läßt sich mit lebenden avirulenten Pneumokokken kein so guter Schutz erreichen wie mit abgetöteten, virulenten Pneumokokken.

Kauffmann, Bjorneboe und Vammen (39) konnten jedoch nach Immunisierung mit einer stark virulenten und mit einer schwach virulenten Typ-20-Pneumokokkenkultur nachweisen, daß die erzielten Seren keinen Unterschied in ihrem Schutzwert und in ihrem agglutinatorischen Verhalten zeigen. Die Verfasser sind der Ansicht, daß eine hohe Virulenz, zumindest für Typ-20-Pneumokokken, nicht erforderlich ist, um nach Immunisierung ein hochwertiges Serum zu erzielen. Andere Seren, die mit schwach virulenten Pneumokokken gewonnen worden waren, erwiesen sich bezüglich ihres Agglutinationsvermögens und ihres Schutzwertes als sehr unterschiedlich. Von ausschlaggebender Bedeutung ist, daß die zur Immunisierung verwendeten Pneumokokken grampositiv und kapselhaltig sind.

4.) Immunisierung mit Pneumokokkenextrakten

Wie schon erwähnt, können durch Immunisierung mit Nährlösung, in denen Pneumokokken gewachsen sind, die aber keine Keime mehr enthalten, Antikörper gegen Pneumokokken hervorgerufen werden (Klemperer (43)). Nach Meyer und Sukneff (48) ist bei Kaninchen und Mäusen mit Pneumokokken vom Typ I, die durch Galle aufgelöst wurden, eine hohe aktive Immunität zu erzeugen. Die Seren immunisierter Kaninchen enthielten jedoch nur mäßige Mengen auf Typ II übergreifender Schutzstoffe. Agglutinine konnten in den Seren nicht nachgewiesen werden.

Dubos (18) gelang es durch Immunisierung mit dem Filtrat von Pneumokokken des Typ I ein Serum von hohem Schutzwert zu gewinnen. Das Serum der immunisierten Kaninchen war in der Lage, Mäuse gegen die 100 000fach tödliche Dosis einer Pneumokokkenkultur des Typ I und gegen die 1 000fach tödliche Dosis einer Kultur des Typ III zu schützen.

Zur Herstellung des Antigens wurden Pneumokokken des Typ I zuerst mit einer Azetat-Pufferlösung (pH 4, 2) und dann mit einem Phosphatpuffer (pH 7, 5) aufgeschwemmt. Durch diese Behandlung waren alle Keime gramnegativ geworden. Das Filtrat dieser gramnegativen Pneumokokken wurde als Antigen verwendet. Das im Filtrat gelöste Antigen konnte bei pH 4, 2 mit Essigsäure gefällt und bei neutraler Reaktion wieder gelöst werden.

5.) Abtötung der Pneumokokken durch Formalin

Wie aus der nachfolgenden Tabelle von T a o (64) hervorgeht, können Pneumokokken schon durch kleine Mengen von Formalin abgetötet werden; die Formalineinwirkung ist von der Temperatur abhängig.

Nach Stunden	Formalinwirkung bei 17° C			bei 37° C		
	Formalinzusatz			Formalinzusatz		
	0,1 %	0,3 %	0,5 %	0,1 %	0,3 %	0,5 %
4	100%+	50%-	100%-	50%-	100%-	100%-
8	100%+	100%-	100%-	80%-	100%-	100%-
24	80%-	100%-	100%-	80%-	100%-	100%-
48	95%-	100%-	100%-	100%-	100%-	100%-
78	100%-	100%-	100%-	100%-	100%-	100%-

+ = Es sind noch lebende Pneumokokken nachzuweisen

100%- = 100% der Pneumokokken sind abgetötet

Pico und Negrete (57) wiesen darauf hin, daß wässrige Suspensionen von Pneumokokken ihre antigene Wirksamkeit rasch verlieren. Ein Zusatz von 0,5 % Formalin zu der Keimaufschwemmung fixiert jedoch alle antigenen Komponenten der Pneumokokken. Die formalinierte Suspension behält ihre spezifisch agglutinogene, komplementbindende und präzipitinogene Antigenfunktion.

Auch Goodner, Horsfall und Dubos (27) erklärten, daß hitzeabgetötete Pneumokokken ihren grampositiven Charakter und ihre antigenen Eigenschaften höchstens eine Woche lang behielten.

Unter der Einwirkung von Formalin konnten jedoch die grampositive Struktur und die antigenen Eigenschaften der Pneumokokken in ihrer ursprünglichen Form erhalten werden. Wird das Formalin wieder aus der Pneumokokkensuspension entfernt, so gewinnen die autolytischen Fermente ihre Aktivität zurück, die Kokken werden gramnegativ und lösen sich auf. Kauffmann, Bjorneboe und Vammen (39) resuspendierten die ausgeschleuderten Keime in einer Sörensen-Pufferlösung, die einen Formalingehalt von 0,2 % enthielt, um die autolytischen Fermente inaktiv zu halten. Unter der Formalin-

einwirkung behielten die Pneumokokken ihren grampositiven Charakter und ihre Kapsel mehrere Monate lang.

Da nun Kaninchen, die über längere Zeit mit formalinaktivierten Pneumokokken immunisiert werden, ständig kleine Mengen Formalin i. v. gespritzt bekommen, ist mit einer Schädigung des Kaninchenorganismus durch den Formalingehalt des Impfstoffes zu rechnen. So stellten Barnes und White (6) fest, daß bei Immunisierung mit formalinaktivierten Typ-I-Pneumokokken mehr Kaninchen starben, als während der Immunisierung mit hitzeabgetötenen Typ-I-Pneumokokken.

6.) Die Abtötung von Bakterien durch Einwirkung von Röntgenstrahlen

a.) Strahlenwirkung

Röntgen- oder γ -Strahlen können mit dem ultravioletten Licht oder mit dem sichtbaren Licht verglichen werden. Da sie jedoch viel kurzwelliger sind, ist auch ihre Quantenenergie größer; und zwar 10^4 mal größer als die Energie des ultravioletten Lichtes. Die Absorption des infraroten, sichtbaren und ultravioletten Lichtes hängt von der molekularen Struktur des absorbierenden Mediums ab. Dagegen wird die Energie der Röntgen- oder γ -Strahlen fast ganz dadurch absorbiert, daß aus den Atomen, die von Strahlen durchquert werden, Elektronen herausgelöst werden. Dieser Prozeß ist unabhängig davon, wie die Atome in den Molekülen gebunden sind. Wird ein Röntgen- oder γ -Quant von einem Molekül absorbiert, so verliert das Atom ein Elektron. Die aufgenommene Quantenenergie ist jedoch größer als die Energie, die notwendig wäre, ein Elektron aus dem Atomverband zu lösen. Diese überschüssige Energie wird dem Elektron als kinetische Energie mitgegeben. Die kinetische Energie des Elektrons ist nun groß genug, um seinerseits die Atome, die es durchquert, zu ionisieren.

Die erzeugten Ionen sind nicht über die ganze bestrahlte Lösung verteilt, sondern sie treten längs der Spur der ausgelösten Elektronen auf (4).

b.) Direkte und indirekte Strahlenwirkung

Biologische Effekte ionisierender Strahlen zeigen sich in einer chemischen Änderung gewisser Zellbestandteile. Die Änderung des chemischen Aufbaues kann direkt oder indirekt zustande kommen.

a.) Direkte Wirkung: Das Molekül, an dem die Änderung geschieht, wird selbst dadurch ionisiert, daß ein Elektron das Molekül durchquert.

b.) Indirekte Wirkung: Das betrachtete Molekül absorbiert die Energie nicht selbst, sondern erhält diese indirekt durch Übertragung von einem anderen Molekül.

Der Unterschied ist an bestrahlten, wässrigen Lösungen besonders deutlich zu erkennen. Die Ionisation von Wassermolekülen - als Folge einer Bestrahlung - führt zu freien Radikalen. Die freien Radikale können als chemische Einheiten, die ein unpaares Elektron besitzen, aufgefaßt werden. Durch das Bestreben, ihre Elektronenzahl und damit ihre Ladung wieder auszugleichen, haben diese Radikale eine außerordentliche Reaktionsfähigkeit. Bei einem Zusammenstoß entsteht in den meisten Fällen sofort eine Verbindung zwischen zwei Radikalen. Die Geschwindigkeit, mit der die Radikale verschwinden, d.h. mit der sie sich abzusättigen, hängt sowohl von der Konzentration des Substrats als auch von der Ionisationsdichte ab(4). Die Ionisationsdichte entscheidet außerdem über die örtliche Konzentration der Radikale. Die Energieübertragung bei indirekter Wirkung geschieht durch das Bestreben der durch die Bestrahlung entstehenden Radikale, sich abzusättigen.

c.) Wirkung harter und weicher Strahlen

Wenn die strahlenbiologische Wirkung mit der Ionisationsdichte steigt, so muß für die direkte und indirekte Wirkung angenommen werden, daß eine gewisse Anzahl von Radikalen gleichzeitig mit der biologischen Struktur reagieren, d.h. die biologische Struktur muß einer hohen Konzentration von Radikalen ausgesetzt sein. Dies ist der Fall, wenn ein dicht ionisierendes Teilchen nahe an der biologischen Struktur vorbei oder durch sie hindurchgeht (Treffertheorie)(11). Eine solch intensive Reaktion muß gefordert werden, wenn Chromosome oder Zellmembran oder ähnlich strukturierte Substanzen geschädigt werden sollen.

Eine einzelne chemische Reaktion kann mit synthetischen Vorgängen bei der Inaktivierung eines Gens oder eines Enzyms zusammenwirken, aber nicht eine schon bestehende morphologische Struktur zerreißen. Soll ein solcher Prozeß vor sich gehen, so muß die Ionendichte über einem gewissen Minimum liegen. Bei harten Strahlen wird nur am Ende der Bahn eine genügend hohe Konzentration erzeugt; die Mehrzahl von Ionisationen ist zu weit voneinander entfernt, um die notwendige Konzentration zu erreichen. Bei dicht ionisierenden Strah-

len wird die ganze Bahn von zahlreichen Radikalen umgeben. Der Abstand zwischen Teilchenspur und Wirkungsort nimmt mit der Ionisationsdichte zu, da sich die Hülle der freien Radikale ebenfalls ausdehnt, d. h. der Abstand, um den ein ionisierendes Teilchen den Trefferbereich verfehlen kann, aber trotzdem noch eine Wirkung hervorruft, wird mit Zunahme der Ionisationsdichte größer.

Weiche Strahlen haben deshalb eine größere biologische Wirksamkeit als harte Strahlen.

d.) Abtötung von Bakterien

Lea, Haines und Coulson (45) deuteten die Abtötung von Bakterien als eine Letalmutation, die durch eine einzige Ionisation innerhalb eines empfindlichen Volumens hervorgerufen wird (Treffertheorie Crowther (11)). Die Überlebenskurven waren exponentiell. Nach den Ergebnissen der Arbeiten von Hollaender und Stapleton (57) und anderen Autoren können bei der Abtötung von Bakterien alle Kurventypen (Exponential - bis extreme S - Kurven) vorkommen. Man kann also im Gegensatz zu Lea, Haines und Coulson annehmen, daß mehr als eine Ionisation zur Inaktivierung des Organismus notwendig ist.

Einen unzweideutigen Beweis dafür, daß die Treffertheorie für die Abtötung von Bakterien nicht allein angewandt werden kann, wurde von Hollaender und Mitarbeiter (38) erbracht, die zeigen konnten, daß sowohl Sauerstofffreiheit als auch hinzugefügte Chemikalien eine Schutzwirkung ausüben, die unter optimalen Bedingungen bis zu 98 % betragen kann.

e.) Erholung bestrahlter Bakterien

Stapleton, Billen und Hollaender (60) und Thoday (65) fanden, daß sich Bakterien nach der Bestrahlung bei geeigneter Behandlung (suboptimale Temperaturen, Zusatz verschiedener Chemikalien zum Nährboden) wieder erholen können.

Es sind Anzeichen dafür vorhanden, daß auch unter normalen Bedingungen viele primäre Schädigungen wieder rückgängig gemacht werden und dadurch der Entdeckung entgehen (4).

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material und Methodik

1.) Material:

Für die Versuche wurden die Pneumokokkenstämme der Typen 17 und 21 verwendet, die aus dem Tierhygienischen Institut der Universität Freiburg/Brsg. stammten.

Die Keime waren in zugeschmolzenen Röhrchen in getrocknetem Nährboden konserviert.

Zur Züchtung der Pneumokokken wurden folgende Nährböden verwendet:

- a.) Blutagarplatten (10 % Hammelblut)
- b.) Nicht autoklavierte Rindfleischbouillon mit einem Zusatz von 10 % Rinderserum.
- c.) Ochsenherzbouillon nach Holm, die von Kauffmann, Bjorneboe und Vammen etwas modifiziert worden war. Unmittelbar vor der Beimischung wurde der Ochsenherzbouillon 0,2 % einer 10 %igen Lösung von defibriniertem Kaninchenblut zugesetzt.

Zur Herstellung von Immunseren standen 20 weiße Kaninchen zur Verfügung.

Für Immunisierungsversuche, Anzüchtung der Keime und Mäusepassagen wurden ca. 250 weiße Mäuse verwendet.

2.) Methodik der Vorversuche:

a.) Konservierung und Anzüchtung der Pneumokokken

Um bei den verschiedenen Versuchen Schwankungen in Virulenz, Wachstum und Morphologie zu vermeiden, wurden die Kulturen nach 3 verschiedenen Methoden konserviert.

1. Methode: Pro Typ wurden je 10 Mäuse mit 0,2 ccm einer 17stündigen Serumbouillon i. p. infiziert. 18 Stunden nach der Infektion waren von den mit Typ 17 infizierten Mäusen noch 4 am Leben, von den mit Typ 21 infizierten noch 2. Doch auch die 6 überlebenden Mäuse zeigten deutliche Krankheitserscheinungen.

Die Milz jeder Maus wurde nun in einem locker mit Watte verschlossenen Agglutinationsröhrchen im evakuierten Exsikkator mit Phosphorpentoxyd 2 Tage lang ausgetrocknet. Dann wurden die Röhrchen mit Paraffin verschlossen und bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Zur Anzüchtung wurde eine derartig getrocknete Milz in einem sterilen Glasmörser mit 1,5 ccm Serumbouillon zerrieben. Von diesem Homogenisat erhielt eine Maus 0,5 ccm i. p., 6 - 10 Stunden nach der Injektion konnten aus dem Herzblut der Maus Pneumokokken in Reinkultur gezüchtet werden. Es ist aber zu betonen, daß die Anzüchtung der Pneumokokken aus getrockneter Milz nicht regelmäßig gelang. In einigen Fällen zeigte die mit dem Homogenisat aus getrocknetem Milzmaterial gespritzte Maus keinerlei Krankheitserscheinungen.

2. Methode: 2 - 3 Tropfen einer 16 - 18stündigen Serumbouillon wurden, in der oben beschriebenen Weise, in einem Reagenzglas im evakuierten Exsikkator ausgetrocknet und bei Zimmertemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Zur Anzüchtung wurde die getrocknete Kultur mit 5 - 10 ccm Serumbouillon übergossen und 16 - 18 Stunden bei 37° C bebrütet.

Auch bei dieser Methode kamen Mißerfolge vor.

3. Methode: Ein Reagenzglas mit Truche-Nährboden wurde mit 0,2 ccm einer 16 - 18stündigen Serumbouillon beimpft, 17 Stunden bebrütet und darauf mit gleichen Teilen einer Truche-Gelatine-Lösung gemischt. Die so behandelte Kultur wurde im Eisschrank aufbewahrt.

Zur Ausimpfung wurde der erstarrte Nährboden zunächst im Brutschrank verflüssigt. Dann wurden 10 ccm Ochsenherzbouillon, der 2 - 3 Tropfen einer 10 % defibrinierten Kaninchenblutlösung zugefügt worden war, mit 0,2 ccm des verflüssigten Truche-Nährbodens beimpft.

Auch hier gelang die Anzüchtung nicht immer. Die Beimpfung von gewöhnlicher Serumbouillon mit Pneumokokken aus dem Truche-Nährboden war meist erfolglos.

Vor allen Versuchen wurden die Kulturen ein bis zweimal durch die Maus geschickt. Es wurden nur Pneumokokkenkulturen verwendet, die grampositiv waren und die mit dem homologen Serum einwandfreie Kapselquellung zeigten.

b.) Die Neufeld'sche Kapselquellungsreaktion

Pneumokokken aller Typen haben die Eigenschaft, daß ihre Kapsel unter dem Einfluß des ihrem Typ entsprechenden Serums um das 2 - 3fache ihrer normalen Größe anschwillt (Neufeld (53)).

Technik: Auf einem Objektträger wurde ein kleines Tröpfchen pneumokokkenhaltigen, flüssigen Materials (Peritonealexsudat einer infizierten Maus, Abschwemmung einer Blutplatte, 16 - 18stündige Serumbouillon) mit einem Tropfen des homologen Serums und mit einem Tropfen alkoholischer Methylenblauatlösung vermischt. Um die Zunahme der Kapselgröße deutlicher feststellen zu können, wurde die Mischung auf demselben Objektträger mit physiologischer Kochsalzlösung anstelle des homologen Serums hergestellt. Die Reaktionsgemische wurden mit Deckgläschen bedeckt und mit Ölimmersion untersucht.

Bei positiver Reaktion mußte eine Schwellung der Kapsel nach spätestens 30 Min. eingetreten sein. Es ist vorteilhaft, ein Material zu verwenden, das nicht mehr als 100 000 000 Pneumokokken pro ccm enthält, da sonst die Agglutinationshaufen bei der Beurteilung der Kapselschwellung störend wirken.

c.) Orientierende Virulenzversuche und Keimzählungen

Um einen Überblick über die Virulenz der vorliegenden Pneumokokkentypen 17 und 21 zu bekommen, wurden je zwei Mäuse mit 17stündiger Serumbouillon und mit Verdünnungen dieser Kultur infiziert. Die Pneumokokken beider Typen wurden aus getrockneter Milz angezüchtet und zunächst im Turnus mit Serumbouillon dreimal durch die Maus geschickt. (Mit dem Herzblut einer an Pneumokokkensepsis erkrankten Maus wurden 10 ccm Serumbouillon beimpft. Nach 17stündiger Bebrütung bei 37° C wurden 0,2 ccm der bewachsenen Kultur einer weiteren Maus i. p. injiziert.) Die Serumbouillon, die nach der 3. Mäusepassage beimpft worden war, wurde im Verhältnis 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000 verdünnt. Von jeder Verdünnung erhielten je zwei Mäuse 0,2 ccm i. p. Im einzelnen sah der Versuch folgendermaßen aus:

1. Glas: 10 ccm Serumbouillon, davon 0,2 ccm -- 2 Mäuse i. p.
2. Glas: 0,5 ccm aus Glas 1 + 4,5 ccm sterile Serumbouillon
3. Glas: 0,5 ccm aus Glas 2 + 4,5 ccm sterile Serumbouillon
4. Glas: 0,5 ccm aus Glas 3 + 4,5 ccm sterile Serumbouillon
5. Glas: 0,5 ccm aus Glas 4 + 4,5 ccm sterile Serumbouillon
9. Glas: 0,5 ccm aus Glas 8 + 4,5 ccm sterile Serumbouillon

Zur Keimzählung wurden je 0,1 ccm aus den Verdünnungen 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} auf Blutplatten ausgespatelt und 24 Stunden bebrütet.

d.) Herstellung der Vaccinen

Zur Herstellung der Vaccinen wurden 800 ccm Ochsenherzbouillon pro Typ mit 3 ccm einer 17stündigen Serumbouillon nach 3 Mäusepassagen und mit 1,5 ccm einer 10 %igen Lösung von defibriniertem Kaninchenblut versetzt. Nach einer Bebrütungszeit von 6 Stunden war die Ochsenherzbouillon stark getrübt. Das Wachstum wurde durch folgende Untersuchungen geprüft:

- a.) Färbung nach Gram
- b.) Nachweis der Kapsel mit Hilfe der Neufeld'schen Kapselquellungsreaktion
- c.) Reinheitskontrolle durch Ausspateln von 0,1 ccm der Bouillon auf Blutplatten

e.) Abtötung der Pneumokokken durch Formalin

Zur Abtötung der Keime wurden zu 760 ccm der bewachsenen Ochsenherzbouillon 40 ccm 40 %iges Formalin zugegeben. Das entspricht einer Formalinkonzentration im Nährboden von 2 %. Die Kultur wurde nun zur Verstärkung der Formalinwirkung über Nacht bei 37°C im Brutschrank gehalten. Am anderen Morgen wurden die Pneumokokken 20 Min. bei 4 000 U/Min. auszenrifugiert und mit Sörensen-Pufferlösung, die 0,2 % Formalin enthielt, aufgeschwemmt. Die Einstellung der Keimzahl auf 0,5 - 1,5 Milliarden Keime pro ccm geschah mit Hilfe der Thomas'schen Zählkammer.

f.) Abtötung der Pneumokokken durch Röntgenstrahlen

Die Beimpfung und Bebrütung von 800 ccm Ochsenherzbouillon pro Typ geschah in der oben beschriebenen Weise. Die Bedingungen, unter denen die Formalinvaccine hergestellt worden war, wurden peinlich genau eingehalten. Die Herstellung der durch Röntgenstrahlen abgetöteten Vaccine mußte jedoch in zwei Etappen zu je 400 ccm durchgeführt werden, da aus technischen Grün-

den nur höchstens 2,5 ccm Material bestrahlt werden konnten.

Nach 6stündiger Bebrütung wurden 400 ccm der stark getrübten Ochsenherz-bouillon auszentrifugiert und das Zentrifugat mit Sörensen-Pufferlösung ohne Formalingehalt auf eine Gesamtmenge von 2,5 ccm ergänzt.

Dieses dicke Konzentrat von Pneumokokkenzellen wurde nun in einer Petrischale von 5 cm Durchmesser, die mit einer Cellophanfolie bedeckt war, einer Bestrahlung mit der Siemens-Dermopan-Apparatur ausgesetzt. Der Fokus-Objekt-Abstand betrug 10 ccm bei 50 kV und 25 mA. Die Bestrahlung wurde mit einer Dosis von $1,0 \times 10^6$ r durchgeführt.

Zur Einstellung der Keimzahl pro ccm wurde das bestrahlte Pneumokokkenkonzentrat mit soviel Sörensen-Pufferlösung aufgeschwemmt, bis die Suspension genau die Trübung der Formalinvaccine erreicht hatte.

g.) Keimzahlbestimmungen der Suspensionen bestrahlter Pneumokokken

Je 5 ccm der Aufschwemmungen bestrahlter Pneumokokken beider Typen wurden bei Zimmertemperatur aufbewahrt und täglich, über einen Zeitraum von 7 Tagen, mit Hilfe der Thomas'schen Zählkammer ausgezählt. Am 7. Tag nach der Bestrahlung war eine Auszählung nicht mehr möglich, da unter dem Mikroskop nur noch staubpartikelartige Zellfragmente zu sehen waren.

h.) Aufbewahrung der Vaccinen

Die durch Formalin abgetöteten Vaccinen wurden in sterile, braune Flaschen abgefüllt und mit sterilem Durchstechstopfen verschlossen. Bis zum Gebrauch wurden die Flaschen im Eisschrank aufbewahrt.

Die durch Röntgenstrahlen abgetöteten Vaccinen wurden zu je 5 ccm in sterile Reagenzgläser gefüllt und bei -20°C in der Tiefkühltruhe gehalten.

Die Formalin- und Strahlenvaccinen wurden unmittelbar nach ihrer Herstellung und 14 Tage nach ihrer Herstellung durch Färbung nach Gram und durch die Neufeld'sche Kapselquellungsreaktion untersucht.

i.) Gewinnung und Auswertung von Immuseren

Zur Herstellung der Seren wurden 5 weiße Kaninchen mit 17 F ^(x), 5 mit 17 S,

(x) Im Folgenden soll die Formalinvaccine, entsprechend ihrem Typ, mit 17 F bzw. 21 F und die durch Einwirkung von Röntgenstrahlen hergestellten Vaccinen mit 17 S bzw. 21 S bezeichnet werden.

5 mit 21 F und 5 mit 21 S etwa 8 Wochen lang immunisiert.

Die Pneumokokkenvaccinen wurden nach Erwärmung jeden zweiten Tag langsam i. v. gespritzt. Die Steigerung der Einzeldosen geht aus der Tabelle 6 hervor. Die Kaninchen der Gruppen F und S bekamen stets die gleiche Dosis.

Nach 11 Injektionen (= 4 Wochen) wurden mit steriler Spritze aus der Ohrvene jedes Kaninchens 2 ccm Blut entnommen. Die Blutproben der Kaninchen von jeweils einer Gruppe (17 F und 21 F, 17 S und 21 S) wurden vermischt, auszentrifugiert und das Serum auf seinen Antikörpergehalt geprüft. Nach etwa 8wöchiger Immunisierung wurden alle Kaninchen entblutet.

Die Kaninchen wurden durch i. v. Injektion von ca. 0,7 ccm Thiogonal in eine tiefe, reflexlose Narkose versetzt und aus der Arteria carotis in ein 50 ccm Zentrifugenglas entblutet. Dann wurde das Kaninchenblut zunächst eine halbe Stunde lang im Brutschrank bei 37° C und dann bis zum nächsten Morgen im Eisschrank gehalten. Nach 15 Min. langem Zentrifugieren bei 3 000 U/Min. konnten von jedem Kaninchen ca. 20 ccm Serum gewonnen werden. Die Seren wurden durch Seitz-EK-Filter filtriert, in sterile, braune Flaschen mit sterilem Gummistopfen abgefüllt und im Wasserbad 30 Min. auf 56° C erhitzt. Nach Sterilitätskontrollen wurden die Flaschen im Eisschrank aufbewahrt.

Die Agglutinationsversuche wurden in kleinen Widal-Agglutinationsröhrchen angesetzt. Die Seren wurden im Verhältnis 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 und 1:1 280 verdünnt. Zu 0,2 ccm jeder Serumverdünnung wurden 0,2 ccm Antigen zugefügt. Als Antigen wurden die zur Immunisierung verwendeten F-Vaccinen verwendet. Nach 16 - 18 Stunden bei 50° C im Wasserbad konnten die Antigen-Antikörperreaktionen mit bloßem Auge abgelesen werden.

Zunächst wurde das Serum jedes einzelnen Kaninchens auf seinen Antikörpergehalt geprüft, dann wurden die Seren von jeweils 5 Kaninchen einer Gruppe miteinander vermischt, so daß nun die gesammelten Seren 17 F, 17 S, 21 F, 21 S vorlagen. Die gesammelten Seren wurden nochmals agglutinatorisch geprüft.

Da die Agglutinationstiter der Seren mit der F-Vaccine als Antigen verhältnismäßig niedrig waren, wurden zusätzlich noch Agglutinationen mit hitzgetöteten und mit lebenden Pneumokokken als Antigen verglichen. 10 ccm frischer 17stündiger Serumbouillonkulturen der Typen 17 und 21 wurden 20 Min. bei 4 000 U/Min. ausgeschleudert und bis zum ursprünglichen Volumen in

physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Die Keimzahl der Suspensionen wurde mit Hilfe der Thomas'schen Zählkammer auf ca. 1 500 Millionen Keime pro ccm eingestellt. Je 5 ccm beider Suspensionen wurden im Wasserbad 30 Min. auf 56° C erhitzt und auf Sterilität geprüft. Die übrigen 5 ccm der Typ 17 und Typ 21 Pneumokokkensuspensionen wurden lebend als Antigen verwendet. Die Agglutinabilität der abgetöteten und der lebenden Pneumokokken wurde mit den Seren 17 F bzw. 21 F geprüft.

Nachdem die Seren 17 F, 17 S, 21 F und 21 S 8 Wochen im Eisschrank aufbewahrt worden waren, wurden sie nochmals agglutinatorisch geprüft. Als Antigen dienten die zur Immunisierung benutzten F-Vaccinen.

Zur Ermittlung des Kapselquellungstiters wurden zu 0,2 ccm der Serumverdünnungen 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 usw. je 0,2 ccm Antigen zugefügt.

Als Antigen wurden die F-Vaccinen, die auf 100 Millionen Pneumokokken pro ccm eingestellt worden waren, verwendet. (Der Versuch, die S-Vaccinen als Antigen zu benutzen, scheiterte, da die Reaktionen unter dem Mikroskop sehr undeutlich waren.)

Nach kräftigem Schütteln wurde aus jedem Gläschen, beginnend bei der Serumverdünnung 1:10, je eine Öse mit alkoholischer Methylenblau-Stammlösung angefärbt und 15 Min. nach Herstellung des Reaktionsgemisches unter dem Mikroskop untersucht. Auf diese Weise wurde diejenige Serumverdünnung bestimmt, bei der noch eine deutliche Kapselquellung zu sehen war. Die Fehlergrenze liegt nach Morch (50) bei +- 1 - 2 Verdünnungsstufen.

3.) Aktive Immunisierung von Mäusen

a.) Ermittlung der Schutzwirkung formalinaktivierter Pneumokokken

Die aktive Immunisierung von weißen Mäusen wurde in Anlehnung an die Erfahrungen von Yoshioka (68) und Killian (42) durchgeführt. Pro Typ wurden zunächst je 12 Mäuse mit F-Vaccine immunisiert, um die Grenze der durch aktive Immunisierung mit den Pneumokokkentypen 17 und 21 erreichbaren Immunität festzulegen. Jede Maus bekam 5mal an einem Tag 0,1 ccm der auf 500 000 000 Keime pro ccm eingestellten F Vaccine i. p., 15 Tage nach den Impfungen wurde die Testinfektion mit Pneumokokken, die aus getrockneter Serumbouillon angezüchtet worden waren, durchgeführt.

Die Bereitung des Infektionsmaterials geschah auf folgende Weise:

Eine Maus wurde mit 0,2 ccm der aus getrockneter Serumbouillon hervorgegangenen Kultur infiziert. 8 Stunden nach der Infektion war die Maus deutlich krank. Nun wurden 20 ccm Serumbouillon mit 2 Ösen Herzblut der pneumokokkeninfizierten Maus beimpft. Die Serumbouillon wurde 17 Stunden bei 37° C bebrütet und dann 20 Min. bei 4 000 U/Min. ausgeschleudert. Das Sediment wurde mit 10 ccm Sörensen-Pufferlösung aufgeschwemmt und im Verhältnis 1:1 usw. verdünnt. (Von dieser Keimaufschwemmung wurden Verdünnungen im Verhältnis 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:200 hergestellt.) Die Pneumokokkenaufschwemmungen wurden sofort nach ihrer Herstellung zur Infektion verwendet.

2 Mäuse erhielten	<u>0,3</u> ccm unverdünnte Aufschwemmung	i. p.
2 Mäuse erhielten	<u>0,3</u> ccm der Verdünnung 1:1	i. p.
2 Mäuse erhielten	<u>0,3</u> ccm der Verdünnung 1:5	i. p.
2 Mäuse erhielten	<u>0,3</u> ccm der Verdünnung 1:10	i. p.
2 Mäuse erhielten	<u>0,3</u> ccm der Verdünnung 1:20	i. p.
2 Mäuse erhielten	<u>0,3</u> ccm der Verdünnung 1:200	i. p.

Außerdem wurden 12 nicht immunisierte Mäuse mit 0,2 ccm des gleichen Infektionsmaterials, zur Feststellung der Virulenz der Pneumokokken Typ 17 und 21, infiziert. Die immunisierten und die nicht immunisierten Mäuse erhielten die gleichen Verdünnungen. Die immunisierten Mäuse erhielten also jeweils von der gleichen Verdünnung 0,1 ccm mehr als die nicht immunisierten Mäuse. Der Grund für diese Maßnahme war folgender:

Da zu den Versuchen dieser Arbeit Pneumokokken schwacher Virulenz verwendet wurden, war nach aktiver (und passiver) Immunisierung keine hohe Schutzwirkung der Vaccinen (bzw. der Seren) zu erwarten (Yoshioka (68), Kilian (42), Kauffmann, Bjorneboe und Vammen (39)).

Die Dosis für immunisierte Mäuse wurde deshalb um 0,1 ccm erhöht, um auch eine geringe Schutzwirkung im Rahmen der verwendeten Verdünnungen erfassen zu können.

b.) Vergleich der immunisierenden Wirkung der F-Vaccine mit der immunisierenden Wirkung der S-Vaccine

Um der Frage näher zu kommen, ob sich durch aktive Immunisierung von Mäusen, einerseits mit formalinaktiviertem, andererseits mit bestrahlten Pneumokokken, Unterschiede im erreichbaren Immunitätsgrad abzeichnen, wurden pro Pneumokokkentyp 40 Mäuse immunisiert. 20 Mäuse bekamen F- und 20 Mäuse S-Vaccine.

Die Methode der Immunisierung und die Bereitung des Infektionsmaterials wurde, peinlich genau, in derselben Weise vorgenommen, wie bei den oben beschriebenen Vorversuchen. Die Zeit zwischen Impfung und Infektion betrug ebenfalls 15 Tage. Die Mäuse erhielten jedoch nicht mehr konzentrierte Aufschwemmung und 5 Verdünnungen, sondern die zwei Verdünnungen, die im Vorversuch der kleinsten tödlichen Dosis, für immunisierte Mäuse, am nächsten kamen. Die Testinfektion wurde deshalb bei beiden Typen mit den Verdünnungen 1:1 und 1:10 durchgeführt. Die Infektionsdosis (0,3 ccm) entsprach der des Vorversuches. Auf diese Weise bestand die Aussicht, einen eventuell gegebenen Unterschied in der Schutzwirkung zwischen formalininaktivierten und röntgenstrahlen-inaktivierten Pneumokokken nach aktiver Immunisierung möglichst genau erfassen zu können.

4.) Serumschutzversuche

Durch folgende Versuche sollte geprüft werden, ob in der Schutzwirkung zwischen den Seren, die durch Immunisierung mit formalininaktivierten Pneumokokken gewonnen wurden (F-Seren) und den Seren, die durch Immunisierung mit bestrahlten Pneumokokken gewonnen wurden (S-Seren), Unterschiede bestehen.

Die Versuchsreihe wurde grundsätzlich in derselben Weise angelegt, wie bei der Vergleichsprüfung der Schutzwirkung nach aktiver Immunisierung mit F- und S-Vaccine.

a.) Ermittlung der Schutzwirkung der Seren, die durch Immunisierung mit formalininaktivierten Pneumokokken gewonnen worden waren

Pro Typ wurden zunächst 12 Mäuse mit je 0,2 ccm F-Serum geimpft. 3 Stunden nach der Impfung wurde die Testinfektion in genau derselben Weise durchgeführt wie bei der Infektion aktiv immunisierter Mäuse. Die Herstellung des Infektionsmaterials geschah, wie in Abschnitt 14 a beschrieben. Die Dosis des Infektionsmaterials betrug ebenfalls 0,3 ccm.

b.) Vergleich der Schutzwirkung der F-Seren mit der Schutzwirkung der S-Seren

Zur Feststellung eines eventuell gegebenen Unterschiedes in der Schutzwirkung zwischen den F- und den S-Seren, wurden für Typ 17 und Typ 21 je 20 Mäusen 0,2 ccm F-Seren und 20 Mäusen 0,2 ccm S-Seren i. p. gespritzt. Wie im Vorversuch wurden die immunisierten Mäuse 3 Stunden nach der Impfung mit

0,3 ccm der Pneumokokkensuspension des dem Serum entsprechenden Typ infiziert. Für die Mäuse, die mit Typ 17 F- und S-Serum immunisiert worden waren, wurde die Pneumokokkenaufschwemmung Typ 17 in den Verdünnungsverhältnissen 1:10 und 1:20 gewählt. Die mit Typ 21 F- und S-Seren immunisierten Mäuse wurden mit Pneumokokkenaufschwemmung Typ 21 unverdünnt und mit dem Verdünnungsverhältnis von 1:1 infiziert.

Zur Kontrolle wurden je 2 Mäuse pro Pneumokokkentyp und pro Verdünnung mit der gleichen Keimaufschwemmung infiziert.

Im einzelnen sah der Versuch folgendermaßen aus:

Zahl der Mäuse	immunisiert mit Serum	nach 3 Stunden infiziert mit Verdünnung	Pneumokokken- typ
10 Mäuse	0, 2 ccm	17 F	17
10 Mäuse	0, 2 ccm	17 F	17
10 Mäuse	0, 2 ccm	17 S	17
10 Mäuse	0, 2 ccm	17 S	17
10 Mäuse	0, 2 ccm	21 F	21
10 Mäuse	0, 2 ccm	21 F	21
10 Mäuse	0, 2 ccm	21 S	21
10 Mäuse	0, 2 ccm	21 S	21
10 Mäuse	0, 2 ccm	21 S	21
Kontrollmäuse	nicht immunisiert	infiziert mit Verdünnung	Pneumokokken- typ
2 Mäuse		0, 3 ccm	17
2 Mäuse		0, 3 ccm	17
2 Mäuse		0, 3 ccm	21
2 Mäuse		0, 3 ccm	21

B. Untersuchungsergebnisse

1.) Ergebnisse der Vorversuche

a.) Orientierende Virulenzversuche und Keimzählung

Die nachfolgenden Tabellen sollen einen Überblick über die Virulenz der vorliegenden Pneumokokkentypen 17 und 21 geben.

Die Pneumokokken beider Typen wurden aus der getrockneten Milz einer an Pneumokokkensepsis gestorbenen Maus angezüchtet. Sie wurden, im Turnus mit Serumbouillon, dreimal durch die Maus geschickt. Die Serumbouillon, die mit dem Herzblut der 3. Maus beimpft worden war, wurde im Verhältnis 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000 usw. mit gewöhnlicher Bouillon verdünnt, pro Verdünnung wurden je 2 Mäuse mit 0,2 ccm infiziert.

• Orientierende Virulenzversuche

Tabelle 1

Typ 17

0,2 ccm 17stündige Serumbouillon unverdünnt	++
0,2 ccm Verdünnung 1:10	11 ++
0,2 ccm Verdünnung 1:100	++
0,2 ccm Verdünnung 1:1000	--
0,2 ccm Verdünnung 1:10 000	--

Tabelle 2

Typ 21

0,2 ccm 17stündige Serumbouillon unverdünnt	++
0,2 ccm Verdünnung 1:10	++
0,2 ccm Verdünnung 1:100	++
0,2 ccm Verdünnung 1:1000	- ⁺ ₂
0,2 ccm Verdünnung 1:10 000	--

(+₂ = gestorben am 2. Tag, - = überlebt)

Zu den Keimzählungen wurden von den Verdünnungen 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} und 10^{-9} je 0,1 ccm auf Blutplatten ausgespatelt und diese 24 Stunden bebrütet.

Keimzählungen

Tabelle 3

Typ 17

Verdünnung	Kolonien
10^{-6}	107
10^{-7}	33
10^{-8}	8
10^{-9}	1

Tabelle 4

Typ 21

Verdünnung	Kolonien
10^{-5}	565
10^{-6}	64
10^{-7}	4
10^{-8}	0
10^{-9}	0

Die Pneumokokken der Typen 17 und 21 müssen nach diesen Ergebnissen als schwach virulent bezeichnet werden.

b.) Untersuchung der Pneumokokken nach der Abtötung

Die Pneumokokken der Typen 17 und 21 wurden, unmittelbar nach der Abtötung durch Formalinzusatz und nach der Abtötung durch Einwirkung ionisierender Strahlen, auf ihre Gramfärbbarkeit und auf ihre Kapselquellung, unter dem Einfluß des typenhomologen Serum, untersucht. Folgende Ergebnisse wurden dabei festgestellt:

bb.) Bei Pneumokokken, die durch Formalinzusatz abgetötet wurden:

Typ 17: Bei der Färbung nach Gram lagen die Keime in Ketten zu 12 bis 20 Gliedern. Sie waren alle, ohne Ausnahme deutlich grampositiv. Jeder Diplokokkus war von einem hellen Hof umgeben.

Typ 21: Bei der Färbung nach Gram lagen die Diplokokken einzeln oder in kurzen Ketten zu 4 - 8 Gliedern. Die Keime waren etwas kleiner, als die des Typ 17. Auch die Pneumokokken Typ 21 waren grampositiv und von einem hellen Hof umgeben.

Bei der Kapselquellungsreaktion nach Neufeld wurden die Pneumokokken der Typen 17 und 21 unter dem Einfluß des typenhomologen Serums kräf-

tig agglutiniert. Vor allem am Rande der Agglutinationshaufen konnte eine deutliche Zunahme der Kapselgröße festgestellt werden.

cc.) Bei Pneumokokken, die mit Röntgenstrahlen bestrahlt wurden:

Typ 17: In der Färbung nach Gram lagen die Keime auch hier in Ketten zu 12 - 20 Gliedern. Sie schienen, im Vergleich zu den formalinaktivierten Pneumokokken Typ 17, etwas geschrumpft zu sein. Besonders auffallend war der Verlust ihrer Gramfestigkeit. Nur noch einzelne Keime waren grampositiv gefärbt. Ein heller Hof um den einzelnen Diplokokkus konnte nur vereinzelt festgestellt werden.

Typ 21: In der Färbung nach Gram lagen die Keime einzeln, oder in kurzen Ketten zu 4 - 8 Gliedern. Die Form und die Färbung entsprachen den Pneumokokken Typ 17.

Bei der Kapselquellungsreaktion nach Neufeld wurden sowohl Typ 17 als auch Typ 21 nach Zugabe des typenhomologen Serums sofort agglutiniert. Die Kapsel um den einzelnen Pneumokokkus war jedoch, im Gegensatz zu formalinaktivierten Pneumokokken, sehr undeutlich und nicht vergrößert. Die Keime schienen teilweise in einer strukturlosen, gallertigen Masse zu liegen. Diese Masse hatte an manchen Stellen die Form einer Kapsel ohne Keim. Dabei entstand der Eindruck, als ob sich ein Teil der Keime mit der zur Färbung verwendeten Methylenblau-Stammlösung nicht mehr anfärben ließen.

c.) Keimzahlbestimmungen der Aufschwemmungen bestrahlter Pneumokokken

Die tägliche Auszählung bestrahlter Pneumokokken über einen Zeitraum von 7 Tagen ergab, daß die Keimzahl zwar nicht bemerkenswert absank, aber, daß sich die Keime bei Zimmertemperatur von Tag zu Tag mehr auflösten, so daß sie bereits am 7. Tag nach der Bestrahlung nicht mehr als Diplokokken erkannt werden konnten.

Keimzahlbestimmungen der Aufschwemmungen bestrahlter Pneumokokken

<u>Tabelle 5</u>	<u>Tag der Bestrahlg.</u>	<u>1. Tag nach d. Bestrahlg.</u>	<u>2. Tg.</u>	<u>3. Tg.</u>	<u>4. Tg.</u>	<u>5. Tg.</u>	<u>6. Tg.</u>	<u>7. Tg.</u>
Typ 17	0,8	0,8	0,7	0,8	0,7	0,6	0,6	-
Typ 21	1,0	0,9	0,9	0,9	0,8	0,7	0,6	-

(Erklärung: 0,8 = 0,8 Milliarden Keime pro ccm)

(Es ist zu bemerken, daß die Auszählung der Pneumokokken des Typ 17 wegen der langen Ketten bedeutend schwieriger war als die Zählung der vorwiegend einzeln liegenden Pneumokokken des Typ 21.)

d.) Untersuchung der Pneumokokkenvaccinen nach 14tägiger Aufbewahrung

Wie im vorigen Kapitel angeführt, wurden die F-Vaccinen (Pneumokokken-aufschwemmungen, die durch Formalinzusatz abgetötet wurden) in braunen Flaschen im Eisschrank aufbewahrt, während die S-Vaccinen (Pneumokokken-aufschwemmungen, die durch Einwirkung von Röntgenstrahlen abgetötet wurden) in Reagenzgläsern zu je 5 ccm in der Tiefkühltruhe bei -20°C eingefroren wurden.

Die Untersuchungen nach 14tägiger Aufbewahrung ergaben folgende Ergebnisse:

F-Vaccinen: Gramfärbbarkeit und Kapselquellung entsprachen den Untersuchungen, die unmittelbar nach der Abtötung der Keime durchgeführt wurden.

S-Vaccinen: Die Untersuchungen ergaben unmittelbar nach dem Auftauen dieselben Ergebnisse wie nach der Bestrahlung. Bereits 24 Stunden nach dem Auftauen waren die Keimaufschwemmungen jedoch völlig klar geworden. Unter dem Mikroskop konnten nur noch einzelne gram-labile bis gram-negative Zellfragmente gesehen werden.

e.) Sterilitätskontrollen

Die F-Vaccinen erwiesen sich nach Ausimpfung auf Blutplatten immer als vollständig abgetötet. Die Blutplatten blieben, nachdem sie bis zu 48 Stunden bei 37°C bebrütet worden waren, immer steril. Von der S-Vaccine wurden insgesamt 10 Sterilitätskontrollen während der Immunisierung der Kaninchen durchgeführt. Von diesen 10 Kontrollen zeigten sich zweimal auf den Blutplatten, die mit 17 S-Vaccine beimpft worden waren, einzelne, sehr kleine, tautropfenartige Kolonien. Unter dem Mikroskop waren gramnegative bis gramlabile Diplokokken zu sehen.

f.) Immunisierung von 20 Kaninchen

Tabelle 6 zeigt den Verlauf der Immunisierung und die Steigerung der Einzeldosen.

Es schien, als ob die Kaninchen die S-Vaccinen besser vertragen würden als die F-Vaccinen. Schon nach einer Immunisierungszeit von 14 Tagen waren die Kaninchen, die mit den F-Vaccinen geimpft wurden, deutlich abgemagert. Die Futteraufnahme dieser Tiere war schlecht. Nach 15 Injektionen (ca. 7 Wochen) starb eines, der mit F-Vaccine immunisierten Kaninchen. Nach 8 Wochen wurde die Immunisierung abgebrochen, da die Kaninchen der F-Gruppe in einem so schlechten Allgemeinzustand waren, daß bei weiterer Immunisierung mit Verlusten gerechnet werden mußte. Der Allgemeinzustand und die Futteraufnahme der Kaninchen, die mit den S-Vaccinen geimpft wurden, war auch nach 8wöchiger Immunisierung noch nicht bemerkenswert verändert.

Nach 4wöchiger Immunisierung wurde der Antikörpergehalt der Seren geprüft. Die Ergebnisse dieser Prüfung sind in Tabelle 6 enthalten.

Die Prüfung der Seren nach 4wöchiger Immunisierung zeigt, daß

- 1.) der Antikörpergehalt des Serum, Typ 17 höher ist, als der des Serum, Typ 21.
- 2.) die F-Vaccinen eine höhere immunisierende Wirkung zu haben scheinen, als die S-Vaccinen.

g.) Agglutinationen mit Kaninchenserum nach 8wöchiger Immunisierung

Tabelle 7 enthält:

- 1.) Die Agglutinationstiter der Seren, die nach 8wöchiger Immunisierung von den einzelnen Kaninchen gewonnen wurden.
- 2.) Die Agglutinationstiter der gemischten Seren von je 5 Kaninchen einer Gruppe (4 Gruppenserum).
 - a.) Serum, das durch Immunisierung mit formalinaktivierten Typ-17-Pneumokokken gewonnen worden war (17-F-Serum).
 - b.) Serum, das durch Immunisierung mit formalinaktivierten Typ-21-Pneumokokken gewonnen worden war (21-F-Serum).
 - c.) Serum, das durch Immunisierung mit bestrahlten Typ-17-Pneumokokken gewonnen worden war (17-S-Serum).
 - d.) Serum, das durch Immunisierung mit bestrahlten Typ-21-Pneumokokken gewonnen worden war (21-S-Serum).

Tabelle 6: Immunisierung von 20 Kaninchen mit Pneumokokkenvaccinen

Datum	Dosis		Prüfung der Seren	
	F-Vaccine	S-Vaccine	F-Serum	S-Serum
	Typ 17 bzw. Typ 21	Typ 17 bzw. Typ 21		
27. II.	0,3 ccm	0,3 ccm		
29. II.	0,3 ccm	0,3 ccm		
1. III.	0,3 ccm	0,3 ccm		
18. III.	0,5 ccm	0,5 ccm		
21. III.	1,0 ccm	1,0 ccm		
23. III.	1,0 ccm	1,0 ccm		
25. III.	1,5 ccm	1,5 ccm		
29. III.	2,0 ccm	2,0 ccm		
31. III.	2,0 ccm	2,0 ccm		
1. IV.	2,0 ccm	2,0 ccm		
5. IV.			Typ 17: 1:40 Typ 21: 1:10	1:20 0

Fortsetzung Tabelle 6:

Datum	Dosis		Prüfung der Seren	
	F-Vaccine Typ 17 bzw. Typ 21	S-Vaccine Typ 17 bzw. Typ 21	F-Serum	S-Serum
6. IV.	2,0 ccm	2,0 ccm		
8. IV.	2,0 ccm	2,0 ccm		
9. IV.	2,5 ccm	2,5 ccm		
11. IV.	2,5 ccm	2,5 ccm		
13. IV.	3,0 ccm	3,0 ccm		
19. IV.	2,5 ccm	2,5 ccm		
21. IV.	2,5 ccm	2,5 ccm		
30. IV.	Entblutung aller Kaninchen			

Tabelle 7: Agglutinationstiter der Kaninchenserum nach 8wöchiger Immunisierung

Kan.Nr.	Agglutinationsritter							
Typ	F-Serum				S-Serum			
F- bzw. S- Vaccine	einzelne Serum	Gruppen- Serum	nach 8wöchiger Aufbewahrung	einzelne Serum	Gruppen- Serum	nach 8wöchiger Aufbewahrung		
17 (1)	gestorben			1:20				
17 (2)	1:320			1:40				
17 (3)	1:320	1:320	1:80	1:20	1:20	0		
17 (4)	1:320			1:20				
17 (5)	1:160			1:20				
21 (1)	1:40			0				
21 (2)	1:80			1:10				
21 (3)	1:40	1:40	1:40	1:10	1:10	0		
21 (4)	1:40			1:20				
21 (5)	1:20			0				

3.) Die Agglutinationstiter der Seren 17 F, 17 S, 21 F und 21 S, nachdem diese ca. 8 Wochen im Eisschrank aufbewahrt worden waren,

Als Antigen wurden zu allen Agglutinationen die zur Immunisierung verwendeten F-Vaccinen benutzt.

Aus der Tabelle 7 sind folgende Ergebnisse zu entnehmen:

- 1.) Wie bei der Prüfung der Seren nach 4wöchiger Immunisierung, hat das Typ-17-Serum einen höheren Agglutinationstiter als das Typ-21-Serum. Die F-Seren beider Typen agglutinieren in höherer Verdünnung als die S-Seren.
- 2.) Nach 8wöchiger Aufbewahrung der Seren im Eisschrank ist der Agglutinationstiter des 17-F-Serum von 320 auf 80 abgesunken. 21-F-Serum blieb unverändert. Die S-Seren beider Typen hatten jegliches Agglutinationsvermögen verloren.

h.) Vergleich zwischen der Agglutinabilität hitzeabgetöteter und lebender Pneumokokken

In Tabelle 8 wird die Agglutinabilität hitzeabgetöteter Pneumokokkensuspensionen mit der Agglutinabilität von Suspensionen lebender Pneumokokken verglichen. Als Antikörper dienten die F-Seren 17 und 21.

Tabelle 8: Agglutinabilität hitzeabgetöteter und lebender Pneumokokken

Pneumokokkentyp	Antigen	
	hitzeabgetötet	lebend
17	1:320	1:160
21	1:160	1:80

Es ist festzustellen, daß hitzeabgetötete Pneumokokken um eine Serumsverdünnungsstufe höher agglutiniert werden als lebende Pneumokokken. Außerdem werden hitzeabgetötete Typ-21-Pneumokokken um eine Verdünnungsstufe höher agglutiniert als formalininaktivierte Pneumokokken desselben Typs.

i.) Bestimmung der Kapselquellenstiter der F- und S-Seren

Zu diesem Versuch wurden formalininaktivierte Pneumokokkenaufschwemmungen, die mit Hilfe der Thomas'schen Zählkammer auf 100 000 000 Keime pro ccm eingestellt worden waren, verwendet.

Tabelle 9 Ermittlung des Kapselquellungstiters der F- und S-Seren

Typ 17

Serumverdünnung	F-Serum	S-Serum
1:10	+++	+++
1:20	+++	++
1:40	+++	++
1:80	++	+
1:160	+	-
1:320	-	-

Typ 21

1:10	+++	++
1:20	++	+
1:40	++	+
1:80	+	-
1:160	-	-

(Erklärung: +++ = deutliche Kapselquellung
 ++ = Kapselquellung noch sichtbar
 + = Kapselquellung undeutlich)

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die Beobachtung der Neufeld'schen Kapselquellungsreaktion unter dem Mikroskop subjektiv ist, kann nach Tabelle 9 doch gesagt werden, daß die F-Seren in höherer Verdünnung die Pneumokokkenkapsel zum Quellen bringen können als die S-Seren. Außerdem ist der Kapselquellungstiter von Typ 17-Serum höher als der des Typ 21-Serum.

2.) Aktive Immunisierung von Mäusen

a.) Ermittlung der Schutzwirkung formalinaktivierter Typ-17-Pneumokokken

12 Mäuse wurden mit 5 x 0,1 ccm 17 F-Vaccine an einem Tag immunisiert. 15 Tage nach den Impfungen erfolgte die Testinfektion. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengestellt worden.

Tabelle 10

Zahl der Mäuse	Infektionsdosis	Verdünnung	1.	2.	3.	4.	5.	6.
2	0,3 ccm	unverdünnt	t1	tt				
2	0,3 ccm	1:1	t1	t1	t1	t1	t1	t1
2	0,3 ccm	1:5	t1	t1	t1	t1	t1	t1
2	0,3 ccm	1:10	t1	t1	t1	t1	t1	t1
2	0,3 ccm	1:20	11	11	11	11	11	11
2	0,3 ccm	1:200	11	11	11	11	11	11

(Erklärung: 1. = Tag der Infektion
 2. = 1. Tag nach der Infektion
 t = gestorben
 1 = lebt

Mäuse, die nach 6 Tagen noch nicht gestorben waren, wurden als überlebend angesehen.)

Zum Vergleich wurden 12 weitere Mäuse, die aber nicht immunisiert worden waren, mit der gleichen Pneumokokkensuspension infiziert. Die Ergebnisse dieses Kontrollversuches sind in Tabelle 11 zusammengestellt worden

Tabelle 11 Virulenz der Pneumokokken Typ 17

Zahl der Mäuse	Infektionsdosis	Verdünnung	1.	2.	3.	4.	5.	6.
2	0,2 ccm	unverdünnt	tt					
2	0,2 ccm	1:1	tt					
2	0,2 ccm	1:5	t1	tt				
2	0,2 ccm	1:10	t1	t1	tt			
2	0,2 ccm	1:20	t1	t1	tt			
2	0,2 ccm	1:200	11	11	11	11	11	11

Tabelle 11 zeigt, daß 0,2 ccm einer Typ-17-Pneumokokkensuspension im Verdünnungsverhältnis 1:20 beide Mäuse noch tötet. Nach Immunisierung mit 17 F-Vaccine sind dagegen 0,3 ccm der gleichen Pneumokokkensuspension unverdünnt notwendig, um beide Mäuse zu töten (Tabelle 10).

Die Immunisierung mit 21 F-Vaccine wurde in derselben Weise durchgeführt wie mit 17 F-Vaccine. Auch bei Typ 21 erfolgte die Testinfektion 15 Tage nach den Impfungen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengestellt worden.

Tabelle 12 Ermittlung der Schutzwirkung formalinaktivierter
Typ-21-Pneumokokken

Zahl der Mäuse	Infektions-dosis	Verdünnung	1.	2.	3.	4.	5.	6.
2	0,3 ccm	unverdünnt	tt					
2	0,3 ccm	1:1	t1	tt				
2	0,3 ccm	1:5	11	11	t1	t1	t1	t1
2	0,3 ccm	1:10	11	11	11	t1	t1	t1
2	0,3 ccm	1:20	11	t1	t1	t1	t1	t1
2	0,3 ccm	1:200	11	11	11	11	11	11

Die Sterblichkeit nicht immunisierter Mäuse, die mit der gleichen Typ-21-Pneumokokkensuspension infiziert wurden, ist aus Tabelle 13 zu ersehen.

Tabelle 13 Virulenz der Pneumokokken Typ 21

Zahl der Mäuse	Infektions-dosis	Verdünnung	1.	2.	3.	4.	5.	6.
2	0,2 ccm	unverdünnt	tt					
2	0,2 ccm	1:1	tt					
2	0,2 ccm	1:5	tt					
2	0,2 ccm	1:10	t1	tt				
2	0,2 ccm	1:20	tt					
2	0,2 ccm	1:200	11	t1	tt			

Nach Tabelle 13 töten 0,2 ccm einer Typ-21-Pneumokokkensuspension erst im Verdünnungsverhältnis 1:200 beide Mäuse. Nach aktiver Immunisierung werden beide Mäuse nach Infektion mit 0,3 ccm der Typ-21-Pneumokokkensuspension im Verdünnungsverhältnis 1:1 getötet (Tabelle 12).

Diese Versuche zeigen, daß durch aktive Immunisierung mit den F-Vaccinen beider Pneumokokkentypen eine deutliche Schutzwirkung gegen eine nachfolgende Infektion mit den typenhomologen Pneumokokken hervorzurufen ist.

b.) Vergleich zwischen der immunisierenden Wirkung der F-Vaccinen und
der immunisierenden Wirkung der S-Vaccinen

Tabelle 14 gibt einen Überblick über die Sterblichkeit der Mäuse in der Zeit

zwischen Immunisierung und Testinfektion.

Tabelle 14 Sterblichkeit der Mäuse innerhalb 15 Tage nach der Immunisierung

Zahl d. Mäuse	immunisiert mit	Vaccine	gestorben	vor d. Testinfektion lebend
20	5 x 0,1 ccm	17 F	6	von 20 noch 14
20	5 x 0,1 ccm	17 S	2	von 20 noch 18
20	5 x 0,1 ccm	21 F	2	von 20 noch 18
20	5 x 0,1 ccm	21 S	8	von 20 noch 12

Von insgesamt 80 Mäusen waren innerhalb von 15 Tagen nach der Immunisierung 18 gestorben.

Nach Immunisierung mit 17 F-Vaccine war die Sterblichkeit der Mäuse höher als nach Immunisierung mit 17 S-Vaccine. Nach Immunisierung mit den Vaccinen des Typs 21 lagen die Verhältnisse umgekehrt. Zwischen den formalinaktivierten und bestrahlten Pneumokokken kann demnach kein Unterschied in ihrer schädigenden Wirkung nach aktiver Immunisierung festgestellt werden.

In den Tabellen 15 und 16 werden die Schutzwirkungen der F-Vaccinen mit den Schutzwirkungen der S-Vaccinen nach erfolgter Testinfektion verglichen.

Tabelle 15 Vergleich der Schutzwirkung der F-Vaccinen mit der Schutzwirkung der S-Vaccinen
Typ 17

Testinfektion mit		überlebend	
Dosis	Verdünnung	Mäuse, mit F-Vaccine immunisiert	Mäuse, mit S-Vaccine immunisiert
0,3 ccm	1:1	von 7 noch 1	von 9 noch 4
0,3 ccm	1:10	von 7 noch 5	von 9 noch 9

Tabelle 16
Typ 21

Testinfektion mit		überlebend	
Dosis	Verdünnung	Mäuse, mit F-Vaccine immunisiert	Mäuse, mit S-Vaccine immunisiert
0,3 ccm	1:1	von 9 noch 1	von 6 0
0,3 ccm	1:10	von 9 noch 4	von 6 noch 1

Wie die Tabellen zeigen, ist die Schutzwirkung der 17-S-Vaccine etwas höher als die Schutzwirkung der 17 F-Vaccine. Die 21 F-Vaccine verleiht jedoch einen höheren Schutz als die 21 S-Vaccine.

Nach dem Verlauf dieses Versuches kann nach aktiver Immunisierung kein Unterschied in der Schutzwirkung zwischen F- und S-Vaccine festgestellt werden.

3.) Serumschutzversuche

a.) Ermittlung der Schutzwirkung der F-Seren, die nach Immunisierung mit formalininaktivierten Pneumokokken gewonnen worden waren

Tabelle 17 Serumschutzversuch mit Typ 17

Zahl d. Mäuse	Serum-dosis	Testinfektion mit	Verdünnung	1.	2.	3.	4.	5.	6.
2	0,2 ccm	0,3 ccm	unverdünnt	tt					
2	0,2 ccm	0,3 ccm	1:1	t1	t1	tt			
2	0,2 ccm	0,3 ccm	1:5	t1	tt				
2	0,2 ccm	0,3 ccm	1:10	11	t1	t1	tt		
2	0,2 ccm	0,3 ccm	1:20	11	11	11	11	11	11
2	0,2 ccm	0,3 ccm	1:200	11	11	11	11	11	11

Tabelle 17 zeigt, daß 0,2 ccm 17 F-Serum beide Mäuse gegen 0,3 ccm der Typ-17-Pneumokokkensuspension im Verdünnungsverhältnis 1:20 schützen kann, während, wie aus Tabelle 11 hervorgeht, beide nicht immunisierte Mäuse nach Infektion mit 0,2 ccm der gleichen Pneumokokkensuspension im Verdünnungsverhältnis 1:20 getötet werden.

Tabelle 18 Schutzversuch mit Typ 21

Zahl d. Mäuse	Serum-dosis	Testinfektion mit	Verdünnung	1.	2.	3.	4.	5.	6.
2	0,2 ccm	0,3 ccm	unverdünnt	t1	tt				
2	0,2 ccm	0,3 ccm	1:1	11	11	11	11	11	11
2	0,2 ccm	0,3 ccm	1:5	11	11	11	11	11	11
2	0,2 ccm	0,3 ccm	1:10	11	11	11	11	11	11
2	0,2 ccm	0,3 ccm	1:20	11	11	11	11	11	11
2	0,2 ccm	0,3 ccm	1:200	11	11	11	11	11	11

Nach Tabelle 18 ist die Schutzwirkung des 21 F-Serum erheblich stärker als die des 17 F-Serum. Während nach Tabelle 13 nicht immunisierte Mäuse durch 0,2 ccm einer Typ-21-Pneumokokkensuspension 1:200 verdünnt getötet werden, schützt das 21 F-Serum noch gegen 0,3 ccm derselben Typ-21-Pneumokokkensuspension im Verdünnungsverhältnis 1:1.

b.) Vergleich zwischen der Schutzwirkung der F-Seren und der Schutzwirkung der S-Seren

Tabelle 19

Zahl d. Mäuse	immunisiert mit	nach 3 Stunden infiziert mit Verdünnung		Pneumo- kokken- typ	nach 8 Tg. überlebend
10	17 F-Serum	0,3 ccm	1:10	17	10
10	17 F-Serum	0,3 ccm	1:20	17	10
10	17 S-Serum	0,3 ccm	1:10	17	10
10	17 S-Serum	0,3 ccm	1:20	17	10
10	21 F-Serum	0,3 ccm	unverdünnt	21	10
10	21 F-Serum	0,3 ccm	1:1	21	10
10	21 S-Serum	0,3 ccm	unverdünnt	21	10
10	21 S-Serum	0,3 ccm	1:1	21	10

Kontroll- mäuse	nicht immunisiert	infiziert mit Verdünng.		Pneumo- kokken- typ	nach 8 Tg. überlebend
2		0,3 ccm	1:10	17	0
2		0,3 ccm	1:20	17	0
2		0,3 ccm	unverdünnt	21	0
2		0,3 ccm	1:1	21	0

Nach dem Ergebnis dieses Versuches (Tabelle 19) kann in der Schutzwirkung zwischen F- und S-Seren kein Unterschied festgestellt werden, da die Seren unerwarteterweise so gut schützen, daß alle Mäuse am Leben blieben, obwohl zur Testinfektion Pneumokokkenaufschwemmungen in solchen Verdünnungen gegeben wurden, daß, wie aus den Tabellen 17 und 18 ersichtlich ist, ein Teil der Mäuse getötet werden mußte.

Es ist also lediglich festzustellen, daß sowohl Seren, die durch Immunisierung

mit formalinaktivierten Pneumokokken gewonnen wurden, als auch Seren, die durch Immunisierung mit bestrahlten Pneumokokken gewonnen wurden, instande sind, Mäuse gegen eine nachfolgende Infektion mit typenhomologen Pneumokokken zu schützen.

C. Besprechung der Ergebnisse

Diese Arbeit soll einen Beitrag zu der Frage leisten, ob Pneumokokken, die durch Einwirkung weicher Röntgenstrahlen abgetötet worden waren, zur Vaccine- und Serumherstellung brauchbar sind.

Diese Frage ist für die Herstellung von Seren, die zur Behandlung der Pneumokokkeninfektion bei Kälbern verwendet werden sollen, von Bedeutung. Für die Versuche wurden die Pneumokokkentypen 17 und 21 gewählt. Diese Typen gehören zu der Gruppe x, die bei Kälbern viel häufiger vorkommt, als die in erster Linie menschenpathogenen Pneumokokkentypen I, II und III (Hammer (34, 35)). Als Vergleich dienten die gleichen Pneumokokkenkulturen, die durch einen Formalinzusatz von 2 % abgetötet und in einer Sørensen-Pufferlösung mit 0,2 % Formalingehalt aufgeschwemmt wurden. Die Methode, Pneumokokken zur Herstellung einer Vaccine durch Formalinzusatz abzutöten, kann als Mittel der Wahl bezeichnet werden, da Pneumokokken unter dem Einfluß des Formalins ihre grampositive Struktur und damit ihre typenspezifische Antigenität über längere Zeit beibehalten (27, 57, 17, 39).

Kauffmann, Bjorneboe und Vammen (39) gelang es, durch Immunisierung mit Formalinvaccinen von den Pneumokokkentypen 1 - 32 hochwertige Seren zu gewinnen, die so typenspezifisch waren, daß sie auch zu typendiagnostischen Zwecken verwendet werden konnten. Die formalinabgetöteten Pneumokokken blieben mehrere Monate unverändert. Nach Yoshioka (68), Goodner, Horsfall, Dubos (27) und Barnes und White (6) u. a. lassen sich auch durch Immunisierung mit hitzeabgetöteten Pneumokokken hochwertige Seren erzielen. Der Impfstoff mußte jedoch jede Woche frisch hergestellt werden, da hitzeabgetötete Pneumokokken ihren grampositiven Charakter und ihre antigenen Eigenschaften nicht lange behielten.

I. Über den Vergleich zwischen formalinaktivierten Pneumokokken und bestrahlten Pneumokokken

Wie die mikroskopische Untersuchung der bestrahlten Pneumokokken zeigte, hatte die Einwirkung ionisierender Strahlen bei einer Dosis von $1,0 \times 10^6$ r die grampositive Struktur der Pneumokokken teilweise verändert. Einzelne Keime waren noch deutlich grampositiv, die meisten jedoch gramlabil und sogar gramnegativ. Die formalinaktivierten Pneumokokken derselben Typen erwiesen sich dagegen alle als grampositiv.

Auch das Ergebnis der Neufeld'schen Kapselquellungsreaktion zeigte deutliche Unterschiede zwischen formalinabgetöteten und bestrahlten Pneumokokken. Unter der Einwirkung von typenhomologen Seren auf formalinabgetötete Pneumokokken konnte bereits nach 5 Min. eine deutliche Verdickung der Pneumokokkenkapsel beobachtet werden. Die Kapselquellungsreaktion war dagegen bei Pneumokokken, die durch Einwirkung ionisierender Strahlen abgetötet worden waren, auch noch nach 30 Min. undeutlich. Die Beobachtung unter dem Mikroskop vermittelte den Eindruck, als ob die Keime in einer homogenen gallertigen Masse liegen würden. Es schien so, als ob sich die einzelnen Keime mit der zur Färbung verwendeten Methylenblau-Stammlösung nicht mehr anfärben ließen. Dadurch entstand das Bild einer Kapsel ohne Keim.

Kauffmann, Bjorneboe und Vammen (39) stellten die Forderung, daß Pneumokokken, die zur Herstellung hochwertiger typenspezifischer Seren verwendet werden sollen, grampositiv und kapselhaltig sein müssen. Nach Dubos (17) ist der Verlust der grampositiven Struktur mit dem Verlust der typenspezifischen Antigenität der Pneumokokken verbunden.

Die typenspezifische Antigenität ist jedoch von der Polysaccharidstruktur der Pneumokokkenkapsel abhängig (36). Es kann also gesagt werden: Der Verlust der grampositiven Struktur kennzeichnet eine Schädigung oder den Verlust der Pneumokokkenkapsel und damit den Verlust der typenspezifischen Antigenität.

Die Änderung der grampositiven Struktur läßt sich auf verschiedene Weise hervorrufen. So wurden Pneumokokken durch Züchtung bei 39°C gramnegativ (63). Durch Züchtung von Pneumokokken in gallehaltigem Medium oder durch Alternlassen einer Blutagarkultur entstanden R-Formen, die durch Kapselverlust und Änderung der grampositiven Struktur gekennzeichnet waren (7). Pneumokokken dieser Art verloren ihre Agglutinabilität und ihre Pathogenität. Nach Yoshioka (68), Killian (42) und Tani (63) läßt sich mit derart veränderten Pneumokokken keine brauchbare Immunität hervorrufen.

Wie die Untersuchung der bestrahlten Pneumokokken zeigte, waren die genannten Forderungen von Kauffmann, Bjorneboe und Vammen (39) für Pneumokokken, die zur Herstellung einer Vaccine verwendet werden sollen, nicht mehr erfüllt, da die Kapsel und die grampositive Struktur durch die Einwirkung weicher, ionisierender Strahlen weitgehend verändert worden waren.

Die Trübung der bestrahlten Pneumokokkensuspensionen war der Trübung der Formalinvaccine, die 0,5 - 1,5 Milliarden Pneumokokken pro ccm enthielt, angeglichen worden. Nachdem die Strahlenvaccine 10 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden war, konnten mikroskopisch keine Diplokokken mehr nachgewiesen werden. Die Aufschwemmungen beider Pneumokokkentypen waren wasserklar geworden. Die Formalinvaccinen jedoch hatten sich nach 10 Tagen bei Zimmertemperatur und selbst nach 4 Monaten bei Aufbewahrung im Eisschrank nicht verändert. Die formalinaktivierten Pneumokokken waren alle grampositiv und kapselhaltig geblieben.

Nach Avery und Cullen (3) enthalten Pneumokokken eine Reihe von Enzymen, die für die Autolyse der Pneumokokken verantwortlich zu machen sind. Diese autolytischen Fermente können durch Zusatz von Formalin inaktiviert werden (17, 55, 27). Die Autolyse bleibt dann aus.

So konnten auch bei den eigenen Versuchen die Pneumokokkensuspensionen der Typen 17 und 21 durch einen Formalinzusatz von 0,2 % in ihrer ursprünglichen Form erhalten werden. Dadurch war es möglich, zu allen Versuchen die gleichen Formalinvaccinen zu verwenden. Um diesen Vorteil auch bei der Strahlenvaccine zu erreichen, wurden die bestrahlten Pneumokokkensuspensionen unmittelbar nach der Bestrahlung eingefroren, da die autolytischen Fermente durch die Einwirkung ionisierender Strahlen nicht zerstört oder inaktiviert werden konnten.

Nach Sturdza (62) wird jedoch durch Einfrieren und Wiederauftauen von Pneumokokken der Widerstand, den der lebende Pneumokokkus seiner eigenen Autolyse entgegensetzt, vernichtet.

Auch Dubos (16) beschrieb, daß das Einfrieren und Wiederauftauen von Pneumokokken die Autolyse lebender und toter Keime stark beschleunigt, wenn die autolytischen Fermente in aktiver Form vorhanden sind. Das Einfrieren und Wiederauftauen von Pneumokokken ist also kein rein mechanischer Vorgang.

Diese Ergebnisse können durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden.

Nach 14tägiger Aufbewahrung in eingefrorenem Zustand waren die bestrahlten Pneumokokken morphologisch nicht verändert. Unter dem Mikroskop war das gleiche Bild zu sehen wie unmittelbar nach der Bestrahlung. Docn bereits nach 24 Stunden bei Zimmertemperatur konnten keine Diplokokken mehr nachgewiesen werden.

Das Auftreten einer durch Einfrieren und Wiederauftauen beschleunigten Autolyse spricht nach Dubos (16) dafür, daß das autolytische Fermentsystem der bestrahlten Pneumokokken noch in kräftiger, aktiver Form vorhanden ist.

Wie die Sterilitätskontrollen der Strahlenvaccinen zeigten, konnten die Pneumokokken Typ 17 durch die Einwirkung ionisierender Strahlen in einer Dosis von $1,0 \times 10^6$ r nicht in allen Fällen abgetötet werden. Die Ergebnisse der Sterilitätskontrollen, nach denen auf den Blutplatten Diplokokken nachgewiesen werden konnten, waren jedoch so minimal, daß ein Einfluß lebender Pneumokokken nach der Bestrahlung auf die Antikörperbildung bei Kaninchen oder Mäusen nicht befürchtet werden mußte. Das Vorhandensein einzelner lebender Pneumokokken nach der Bestrahlung bei Typ 17 ist möglich, wenn in Betracht gezogen wird, daß die Pneumokokken aus 400 ccm der Nährlüssigkeit zur Bestrahlung auf 2,5 ccm konzentriert wurden. Es ist mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die Ionisation der Strahlen bei einer Dosis von $1,0 \times 10^6$ r durch Streuung in den oberen Schichten der sehr dichten Pneumokokkenaufschwemmung nicht mehr intensiv genug war, um alle Keime vollständig abzutöten. Für die Streuung der Strahlen kann die Bildung langer Ketten bei Typ 17 begünstigend wirken. Außerdem ist nach Stapleton, Billen, Hollander (60) und Thoday (65) eine Erholung bestrahlter Bakterien bei suboptimalen Temperaturen möglich. Inwieweit die Tiefgefrierung in den Erholungsmechanismus bestrahlter Bakterien eingreifen kann, ist noch nicht zu sagen, da auf diesem Gebiet noch zu wenig Erfahrungen vorliegen.

II. Über die Herstellung von Immunsereen mit formalin-aktivierter und mit Röntgenstrahlen-inaktivierten Pneumokokken und über die agglutinatorische Auswertung dieser Seren

Zur Herstellung der Pneumokokkenserum wurden 10 Kaninchen mit Formalin- und 10 Kaninchen mit Strahlenvaccinen nach dem in Tabelle 6 angegebenen Schema immunisiert. Die Immunisierung wurde nach der von Kauffmann, Bjorneboe und Vammen (39) angegebenen Methode durchgeführt. Nach einer Immunisierungszeit von 4 Wochen ergab das durch Immunisierung mit

Formalinvaccine Typ 17 gewonnene Serum (17 F-Serum) einen Agglutinationstiter von 1:40. Nach 8wöchiger Immunisierung war der Agglutinationstiter auf 1:320 angestiegen. 21 F-Serum agglutinierte nach 4 Wochen bis zur Serumverdünnung 1:10 und nach 8 Wochen bis 1:40.

Die Immunisierung mit Pneumokokken Typ 17 und 21, die durch Röntgenstrahlen abgetötet worden waren, ergab Seren (S-Seren) mit erheblich niedrigeren Agglutinationstitern als die der F-Seren. Nach 4wöchiger Immunisierung mit Strahlenvaccine hatte das 17 S-Serum einen Agglutinationstiter von 1:20 erreicht. Das 21 S-Serum agglutinierte jedoch bereits in einer Verdünnung im Verhältnis 1:10 formalinaktivierter Typ 21 Pneumokokken nicht mehr. Nach 8wöchiger Immunisierung wurden Typ-21-Pneumokokken von dem 21 S-Serum im Verdünnungsverhältnis 1:10 deutlich agglutiniert, während das Agglutinationsvermögen des 17 S-Serum nicht weiter angestiegen war.

Nachdem die Kaninchenserum 8 Wochen im Eisschrank aufbewahrt worden waren, wurde ihr Agglutinationsvermögen noch einmal geprüft. Als Antigen wurden die zur Immunisierung benutzten Formolvaccinen verwendet.

Nach der Tabelle 7 war der Agglutinationstiter des 17 F-Serums von 320 auf 80 abgesunken. Der Titer des 21 F-Serums war unverändert geblieben.

Die S-Seren beider Typen hatten jegliches Agglutinationsvermögen verloren.

Der Verlust des Agglutinationsvermögens von Pneumokokkenserum wurde schon von Neufeld (53) beschrieben. So blieben die von Neufeld hergestellten Seren nur 14 Tage unverändert, dann fielen die Agglutinationstiter rapide ab. Die Verminderung des Agglutinationsvermögens war bei Seren mit Karbolzusatz und bei unbehandelten Seren gleich.

Kauffmann, Bjorneboe und Vammen (39) konnten jedoch die Pneumokokkenserum durch Behandlung mit Kaolin und Chinosol so haltbar machen, daß innerhalb eines Jahres eine Abschwächung des Agglutinationstiters von nur etwa 10 % eintrat.

Bei den eigenen Untersuchungen bestand keine Notwendigkeit, die Seren durch Behandlung für längere Zeit haltbar zu machen, da die Agglutinationen und die Immunisierungsversuche innerhalb von 10 Tagen nach der Entblutung der Kaninchen durchgeführt wurden.

Die Ermittlung der Kapselquellungstiter zeigte nach 8wöchiger Immunisierung dieselben Unterschiede wie die Agglutinationsversuche.

17 F-Serum rief bei einer Verdünnung von 1:40 noch eine deutliche Kapsel-

quellung bei formolinaktivierten Pneumokokken hervor. Beim 21 F-Serum lag die Grenze einer deutlichen Kapselquellung bei der Serumverdünnung im Verhältnis 1:10.

Die S-Seren waren, wie bei den Agglutinationsversuchen, minderwertiger. Bei einer Verdünnung des 17 S-Serums im Verhältnis 1:10 konnte noch eine deutliche Verdickung der Pneumokokkenkapsel beobachtet werden, während 21 S-Serum bei einer Verdünnung im Verhältnis 1:10 die Kapsel nur undeutlich zum Schwellen brachte.

Wahrscheinlich hätten sich die Agglutinationstiter der Typ 17 und Typ 21 Seren durch Immunisierung längere Zeit noch steigern lassen. Kauffmann, Bjorneboe und Vammen (39) hatten durch Immunisierung mit Typ III Pneumokokken nach 4 Wochen einen Agglutinationstiter von 1:80, nach 12 Wochen von 1:160 und erst nach 20 Wochen Agglutinationstiter von 1:1280 erreicht. Die Kaninchen wurden dabei 3wöchentlich mit 1 - 2 ccm Formalinvaccine i. v. gespritzt. Die Verfasser benutzten für jeden Pneumokokkentyp 50 - 100 Kaninchen. In Anbetracht dieser großen Zahl der Versuchstiere waren die Verluste während der Immunisierung unbedeutend.

Bei der vergleichenden Immunisierung mit Formalin- und Strahlenvaccine wurden alle 20 Kaninchen nach einer Immunisierungszeit von 8 Wochen entblutet, da die Tiere der F-Gruppe schlecht Futter aufnahmen und stark abgemagert waren. Eines der Kaninchen, die Formalinvaccine von Typ 17 erhielten, war nach 6wöchiger Immunisierung gestorben. Die mit Strahlenvaccine immunisierten Tiere waren nach einer Immunisierungszeit von 8 Wochen noch in gutem Allgemeinzustand und die Futteraufnahme war nicht verändert. Damit konnte auch in der Wirkung auf den Kaninchenorganismus ein deutlicher Unterschied zwischen den F- und den S-Vaccinen festgestellt werden.

Nach Neufeld (53) ist der Antikörpergehalt des Kaninchenserums von der Reaktion abhängig, die das Tier bei der letzten Injektion mitgemacht hat. Der Antikörpergehalt des Serums ist um so höher, je stärker die Reaktion des Tieres war, d. h. je mehr der Organismus durch die Immunisierung belastet wurde.

Die Immunisierung mit den F-Vaccinen hatte erheblich stärkere Reaktionen hervorgerufen als die Immunisierung mit den S-Vaccinen. Der Antikörpergehalt der F-Seren müßte demnach höher sein als der der S-Seren. Wie aus den Agglutinations- und Kapselquellungsversuchen hervorgeht, sind die F-Seren tatsächlich hochwertiger als die S-Seren.

Die starke Abmagerung der Kaninchen, die mit formolinaktivierten Pneumokokken immunisiert worden waren, kann jedoch nicht nur auf eine höhere Antigenität der F-Vaccinen im Gegensatz zu den S-Vaccinen zurückgeführt werden. Sicher übt auch der Formalingehalt der F-Vaccinen einen schädigenden Einfluß auf den Kaninchenorganismus aus. So stellten Barnes und White (6) bei der Immunisierung mit Pneumokokken Typ I Formalin vaccine eine höhere Sterblichkeit der Kaninchen fest als bei Immunisierung mit hitzeabgetöteten Typ I Pneumokokken.

III. Über die passive Immunisierung von Mäusen mit den gewonnenen Seren und über die aktive Immunisierung von Mäusen mit formalinaktivierten und Röntgenstrahlen inaktivierten Pneumokokken

Nach Kauffmann, Bjorneboe und Vammen (39) besteht eine Parallelität zwischen Agglutinationstiter und Schutzwert der Pneumokokkenserum. Nachdem die F-Seren höhere Agglutinationstiter aufwiesen als die S-Seren, konnte nach passiver Immunisierung von Mäusen von den F-Seren eine höhere Schutzwirkung erwartet werden als von den S-Seren.

Der Kapselquellungstiter kann jedoch nicht als Kriterium für den Wert eines Pneumokokkenserums herangezogen werden, da es nach Neufeld (53) und Morch (49, 50) Seren von hohem Schutzwert gibt, die die Kapsel der typenhomologen Pneumokokken überhaupt nicht quellen lassen. Zur Ermittlung der Schutzwerte der Seren wurden 80 weiße Mäuse passiv immunisiert. Pro Pneumokokkentyp und Serumwert wurden je 20 Mäuse geimpft.

Wie Tabelle 19 zeigt, blieben nach der Testinfektion alle Mäuse am Leben, obwohl die im Vorversuch teilweise tödliche Dosis gegeben wurde. Die nicht immunisierten Kontrollmäuse starben alle.

Zur Ermittlung der Schutzwirkung, die durch aktive Immunisierung mit F-Vaccine und mit S-Vaccine bei Mäusen hervorgerufen werden kann, wurden 80 Mäuse nach der von Yoshioka (68) und Killian (42) angegebenen Methode immunisiert. 40 Mäuse wurden mit F-Vaccine geimpft und 40 mit S-Vaccine. Wie Tabelle 14 zeigt, starben in der Zeit zwischen Impfung und Infektion 18 von 80 Mäusen. (Die mit dem Herzblut der gestorbenen Mäuse beimpften Blutplatten blieben jedoch nach Bebrütung steril.) Die Sterblichkeit der Mäuse nach der Impfung läßt keine Beziehung zur Art des Impfstoffes erkennen.

Die mit 17 S-Vaccine immunisierten Mäuse waren, wie Tabelle 18 zeigt, ge-

gen eine Infektion mit Pneumokokken Typ 17 besser geschützt als die Mäuse, die 17 F-Serum erhalten hatten.

Bei Pneumokokkentyp 21 jedoch lagen die Verhältnisse umgekehrt. Die mit Typ 21 F-Vaccine immunisierten Mäuse waren gegen eine nachfolgende Infektion mit Typ 21 Pneumokokken besser geschützt als die Mäuse, die mit Typ 21 S-Vaccine immunisiert worden waren (Tabelle 19). Nach den Ergebnissen der Immunisierungsversuche kann gesagt werden, daß sowohl aktive Immunisierung mit Formalin- und Strahlenvaccine als auch passive Immunisierung mit den Seren, die durch Immunisierung mit Strahlen- bzw. Formalinvaccine gewonnen worden waren, eine schützende Wirkung gegen eine nachfolgende Infektion mit Pneumokokken hervorruft.

Um eventuell gegebene Unterschiede in der Schutzwirkung zwischen formolinaktivierten und bestrahlten Pneumokokken nach aktiver Immunisierung feststellen zu können, mußten jedoch bedeutend mehr Mäuse verwendet werden. Außerdem wäre es angebracht, möglichst hochvirulente Pneumokokken zu verwenden.

Auch die Herstellung von Pneumokokkenserum durch Immunisierung von Kaninchen gelingt mit hochvirulenten Pneumokokken eher als mit schwachvirulenten.

Kauffmann, Bjorneboe und Vammen (39) zeigten zwar, daß Immunisierung mit einer stark virulenten und mit einer schwach virulenten Typ 20 Pneumokokkenkultur gleichwertige Seren hervorruft, aber die Seren anderer schwachvirulenter Pneumokokkentypen waren in ihrem Agglutinationsvermögen und in ihrem Schutzwert sehr unterschiedlich. Hochvirulente Pneumokokken ergaben dagegen immer hochwertige Seren.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit und nach dem Studium der einschlägigen Literatur kann abschließend gesagt werden, daß die Abtötung von Pneumokokken der Typen 17 und 21 durch die Einwirkung weicher Röntgenstrahlen zur Herstellung einer Vaccine oder zur Serumherstellung aus folgenden Gründen ungeeignet ist:

- 1.) Die Bestrahlung von Pneumokokken der Typen 17 und 21 verändert die grampositive Struktur und die Pneumokokkenkapsel. Die Gramfestigkeit und die Kapsel sind jedoch nach Kauffmann, Bjorneboe und Vammen (39, Dubos (17), Heidelberger, Goebel und Avery (36) u. a. zur Erzielung hochwertiger, typenspezifischer Seren unerlässlich.

- 2.) Die Bestrahlung von Pneumokokken der Typen 17 und 21 mit einer Dosis von $1,0 \times 10^6$ r ist nicht imstande, das Fermentsystem, das für die Autolyse der Pneumokokken verantwortlich ist, zu inaktivieren oder zu zerstören. Ein Pneumokokkenimpfstoff, dessen Keime durch Bestrahlung abgetötet wurden, müßte daher, wie hitzeabgetötete Pneumokokkenvaccinen, mindestens alle 8 Tage frisch hergestellt werden.
- 3.) Die Antigenität formolinaktivierter Pneumokokken scheint, den Agglutinationsversuchen und der unterschiedlichen Reaktion der Kaninchen auf die Immunisierung nach zu schließen, erheblich höher zu sein als die Antigenität bestrahlter Pneumokokken.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde untersucht, ob durch weiche Röntgenstrahlen in einer Dosis von $1,0 \times 10^6$ r abgetötete Pneumokokkenkulturen der Typen 17 und 21 zur Vaccine- und Serumherstellung verwendet werden können.

Zum Vergleich wurden formolinaktivierte Pneumokokken der gleichen Typen verwendet. Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

- 1.) Die Einwirkung von Röntgenstrahlen auf Pneumokokken der Typen 17 und 21 veränderte weitgehend ihren grampositiven Charakter und die Kapselquellungsfähigkeit unter dem Einfluß der typenhomologen Seren. Die formolinaktivierten Pneumokokken behielten dagegen ihre grampositive Struktur und ihr Kapselquellungsvermögen.
- 2.) Die bestrahlten Pneumokokken lösten sich innerhalb von 10 Tagen bei Zimmertemperatur und innerhalb von 24 Stunden nach Einfrieren und Wiederauftauen völlig auf. Die formolinaktivierten Pneumokokken blieben sowohl nach 10 Tagen bei Zimmertemperatur als auch nach Aufbewahrung über 4 Monate im Eisschrank unverändert.
- 3.) Nach 8wöchiger Immunisierung von Kaninchen mit abgetöteten Pneumokokkenkulturen hatte das 17 F-Serum (Serum, das durch Immunisierung mit formolinaktivierten Typ-17-Pneumokokken gewonnen wurde) einen Agglutinationstiter von 1:320 und einen Kapselquellungstiter von 1:40. Das 17 S-Serum (Serum, das durch Immunisierung mit bestrahlten Typ-17-Pneumokokken gewonnen wurde) hatte einen Agglutinationstiter von 1:20 und einen Kapselquellungstiter von 1:10. Typ-21-F-Serum agglutinierte noch im Verdünnungsverhältnis 1:80. Die Neufeld'sche Kapselquellungsreaktion war bei dem Verdünnungsverhältnis 1:10 noch deutlich. Typ-21-S-Serum agglutinierte bis zur Verdünnung 1:10. Die Neufeld'sche Kapselquellungsreaktion war bei der Serumverdünnung 1:10 undeutlich. Die Kaninchen, denen formolinaktivierte Pneumokokken gespritzt wurden, waren erheblich stärker abgemagert als die Kaninchen, die mit bestrahlten Pneumokokken immunisiert wurden.
- 4.) Die aktive Immunisierung von Mäusen ergab keinen Unterschied in der erreichbaren Schutzwirkung zwischen formolinaktivierten und bestrahlten Pneumokokken.
- 5.) Die Untersuchungen ergaben somit, daß sich durch Röntgenstrahlen abgetötete Pneumokokken weder zur Vaccine-Herstellung noch zur Gewinnung von Immunseren eignen.

V. LITERATURVERZEICHNIS

- 1.) Avery, O.: The distribution of immune bodies
occurring in antipneumococcus serum.
J. exp. Med. 21, 133 (1915)
- 2.) Avery, O. und
Heidelberger, M.: Immunological relationship of cell consti-
tuents of pneumococcus I.
J. exp. Med. 38, 81 (1923)
- 3.) Avery, O. und Cullen: zit. nach Neufeld und Etinger-
Tulczynska (55)
- 4.) Baco, F. M. und
Alexander, P.: Grundlagen der Strahlenbiologie.
Georg Thieme-Verlag Stuttgart (1938)
- 5.) Bail, O.: zit. nach Neufeld und Schnitzer (56)
- 6.) Barnes, L. A. und
White, B.: The antibody response of rabbits during
prolonged immunization with type I
pneumococcus vaccine.
Amer. J. Hyg. 21, 35 (1935)
- 7.) Baurhenn, W.: Experimentelle Untersuchungen zur Variabi-
lität und zur Analyse der R-S Umwandlung
von Pneumokokken mit besonderer Berück-
sichtigung der Gruppe X.
Zbl. Bakter. I. Orig. 126, 68 (1932)
- 8.) Biondi: zit. nach Mennes (47)
- 9.) Cole: Pneumococcus hemotoxin.
J. exp. Med. 20, 346 (1914)
- 10.) Cole und Moore: zit. nach Yoshioka (68)
- 11.) Crowther, J. A.: Proc. roy. Soc. 96, 207 (1924)
12. Christiansen, M.: Diplokokkeninfektionen bei Kälbern und
das Verhalten der Diplokokken zum Pneumo-
kokkus des Menschen.
Z. Hyg. 14, 101 (1913)

- 13.) Cooper, G. M., Edwards, M. und Rosenstein, C.: The separation of types among the pneumococci hitherto called group 4 and the development of the therapeutic-antiserum. J. exp. Med. 49, 461 (1929)
- 14.) Dochez, A. R.: The presence of protective substances in human serum during lobar pneumonie. J. exp. Med. 16, 665 (1912)
- 15.) Dubos, R. J.: The autolytic system of pneumococci. J. exp. Med. 65, 873 (1937)
- 16.) Ders.: Mechanisme of lysis of pneumococci by freezing and thawing, bille and other agents. J. exp. Med. 66, 101 (1937)
- 17.) Ders.: Ergebnisse der Enzymforschung. J. exp. Med. 8, 135 (1934)
- 18.) Ders.: Immunization of experimental animals with a soluble antigen extracted from pneumococci. J. exp. Med. 67, 799 (1938)
- 19.) Ders.: The effect of the bacteriolytic enzyme of pneumococcus upon the antigenity of encapsulated pneumococci. J. exp. Med. 66, 113 (1937)
- 20.) Felton, L. D. und Dougherty, K. M.: zit. nach Baurhenn (7)
- 21.) Fey, H.: Die Bedeutung der serologischen Typendiagnose bei der Pneumokokkensepsis des Kalbes mit vorläufigen eigenen Typisierungsergebnissen. Schweiz. Arch. Tierhk. 94, 636 (1952)
- 22.) Ficker: zit. nach Neufeld und Schnitzer (56)
- 23.) Foa, Bordini und Uffreduzzi: zit. nach Mennes (47)
- 24.) Fränkel, C.: zit. nach Neufeld und Schnitzer (56)

- 25.) Freund, J. und Behan, M. A.:
Type specific antibody production with living pneumococci in the rabbit. Science 90, 185 (1939)
- 26.) Friel, A. R.:
zit. nach Baurhenn (7)
- 27.) Goodner, K., Horsfall, F. L. und Dubos, R. J.:
Type-specific antipneumococcus-rabbit-serum for therapeutic purposes. Production, processing and standardization. J. Immunol. 33, 279 (1937)
- 28.) Gundel, M.:
Bakteriologische und epidemiologische Untersuchungen über die Besiedlung der oberen Atemwege gesunder Personen mit Pneumokokken. Z. Hyg. 114, 659 (1933)
- 29.) Gundel, M. und Schwarz, Fk. Th.:
Über die Typendifferenzierung und Epidemiologie der Gruppe X der Pneumokokken. Z. Hyg. 113, 498 (1932)
- 30.) Dies.:
Studien über die oberen Atemwege Neugeborener (im Vergleich zu der Mundhöhlenflora der Mutter und des Pflegepersonals) unter besonderer Berücksichtigung ihrer Bedeutung für das Pneumonieproblem. Z. Hyg. 113, 411 (1932)
- 31.) Gundel, M. und Wasu:
Die Bedeutung der Virulenz des Erregers für die Pathogenese menschlicher Pneumokokkenerkrankungen. Z. Hyg. 112, 436 (1931)
- 32.) Griffith, F.:
zit. nach Baurhenn (7)
- 33.) Hackenthal, H. und Bierkowski, E.:
Streptokokkenstudien. Zbl. Bakter. I. Orig. 156, 464 (1951)
- 34.) Hammer, D.:
Die Verteilung der Pneumokokkentypen bei Mensch und Kalb unter besonderer Berücksichtigung der Übertragungsmöglichkeit. Zbl. Vet. med. II, 218 (1955)

- 35.) Hammer, D.: Das Vorkommen von Pneumokokkentypen bei Kälbern mit Berücksichtigung der Epidemiologie und Klinik.
Zbl. Bakter. I. Orig. 161, 259 (1954)
- 36.) Heidelberger, M., Goebel, W. F. und Avery, O.: The soluble specific substance of pneumococcus III.
J. exp. Med. 42, 727 (1925)
- 37.) Hollaender, A. und Stapleton, G. E.: Physiol. Rev. 33, 77 (1953)
- 38.) Hollaender, A., Stapleton, G. E. und Billen, D.: Trans. Faraday. Soc. 49, 331 (1953)
- 39.) Kauffmann, F., Bjorneboe, M. und Vammen, B.: Über die Herstellung und Bewertung von Kaninchen-Pneumokokkenserum.
Z. Hyg. 121, 36-58 (1938)
- 40.) Kauffmann, F., Morch, E. und Schmith, K.: On the serology of the pneumococcus group.
J. Immunol. 39, 397 (1940)
- 41.) Kämpe, A.: Om pneumokoker som orsak till kalvdiarés.
Skand. Vet. 29, 1001 (1939)
Ref. Jber. Med. 139, 227 (1939)
- 42.) Killian, H.: Versuche über aktive Immunisierung von Mäusen gegen Pneumokokken und Streptokokken.
Z. Hyg. 102, 179 (1924)
- 43.) Klemperer, G. u. F.: Versuche über die Immunisierung und Heilung der Pneumokokkeninfektion.
Berl. klin. Wschr. 28, 833, 869 (1891)
- 44.) Krautstrunk, T.: Beitrag zur Aetiologie des seuchenhaften Kälbersterbens.
Z. Infekt. krankh. d. Haustiere 7, 256 (1910)
- 45.) Lea, D. E., Haines, R. B. und Coulson, C. A.: Proc. roy. Soc. 1, 123 (1937)
- 46.) Levy, E. und Aoki, K.: Über Schutzimpfung gegen Pneumokokken.
Z. Immunitätsforsch. Orig. Bd. VII, Nr. 1/2 (1910)

- 47.) Mennes, F.: Das Antipneumokokkenserum und der Mechanismus der Immunität des Kaninchens. Z. Hyg. 25, 413 (1897)
- 48.) Meyer, H. und Sukneff, W. W.: Über die immunisierende Wirkung von avirulenten Pneumokokken, Kulturfiltraten und Auflösungen virulenter Pneumokokken. Z. Hyg. 109, 78 (1929)
- 49.) Morch, E.: Diagnostic antipneumococcal sera produced by immunization with one or more types of the pneumococcus. Acta. path. skand. 19, 497 (1942)
- 50.) Dies.: Experimentelle Grundlagen der Diagnose und Therapie menschlicher Pneumokokkeninfektionen. Erg. Hyg. 25, 358 (1943)
- 51.) Morch-Lund, E.: The fermenting power of pneumococci. Acta. path. skand. Vol. XXVI, Fasc. 5, 109 (1949)
- 52.) Netter, A.: zit. nach Mennes (47)
- 53.) Neufeld, F.: Über die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorien dieser Agglutination. Z. Hyg. 40, 54 (1902)
- 54.) Neufeld, F. und Haendel: Über die Herstellung und Prüfung von Antipneumokokkenserum und über die Aussicht einer spezifischen Behandlung der Pneumonie. Z. Immunitätsforsch. exp. Therapie 3, 159 (1909)
- 55.) Neufeld, F. und Etinger-Tulczynska, R.: Untersuchungen zur Gallelöslichkeit der Pneumokokken. Arch. Hyg. 103, 107 (1930)
- 56.) Neufeld, F. und Schnitzler, R.: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. S. 913 - 1026 Fischer u. Urban & Schwarzenberg (1928)

- 57.) Pico, C.E. und Negrete, J.:
Contribution à l'étude des antigènes formolé. L'antigène pneumococcique in vitro. C.r. soc. biol. 110, 141 (1932)
- 58.) Römer, O.:
Typenbestimmung von Pneumokokken, die bei Tieren, besonders bei Kälbern nachgewiesen werden.
Medlemsblad for den danske Dyrlægeforening. Jg. 31, 316 (1948)
Ref. Schweiz. Arch. Tierhk. 91, 121 (1949)
- 59.) Schmid, H.:
Pneumokokken.
Fortschritte der Serologie VII, 172, Darmstadt (1955)
- 60.) Stapleton, G.E., Billen, D. und Hollaender, A.:
J. cell. comp. Physiol. 41, 345 (1953)
- 61.) Stryker, L.M.:
zit. nach Baurhenn (7)
- 62.) Sturdza, S.A.:
Sur le mecanisme de la lyse des pneumocoques pur congelation.
C.r. soc. biol. 129 (1938)
- 63.) Tani, T.:
Beiträge zur aktiven Immunisierung gegen Pneumokokken.
Z. Hyg. 103, 204 (1934)
- 64.) Tao, S.M.:
The antigenic response and local reaction, caused by formalinized pneumococcus vaccine. China med. J. 46, 445 (1932)
- 65.) Thoday, J.M.:
J. Genetics 43, 189 (1924)
- 66.) Trautwein, G.:
Die experimentelle Pneumokokkeninfektion des Kalbes.
Sonderdruck aus
Arch. exp. Vet. med. Bd. X (1956)
- 67.) Weichselbaum:
zit. nach Neufeld und Schnitzer (56)
- 68.) Yoshioka, M.:
Beiträge zur Pneumokokkenimmunität.
Z. Hyg. 96, 520 (1922)

Am Schluß meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. A. M e y n für die Überlassung des Themas und für sein jederzeit freundliches und verständnisvolles Entgegenkommen danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. H u g, der mir die Möglichkeit bot, die notwendigen Bestrahlungen am Strahlenbiologischen Institut der Universität München durchzuführen.

Auch Herrn Dr. G e d e k bin ich für seine wertvollen Hinweise und Ratschläge sehr zu Dank verpflichtet.

L e b e n s l a u f

Am 31. März 1934 wurde ich, Günter Vohl, als zweiter Sohn des praktischen Arztes, Dr. med. Karl Vohl und dessen Ehefrau Eleonore, geb. Junginger, in Stuttgart-Weilimdorf geboren. Meine Schulzeit verbrachte ich von 1940 bis 1943 in Stuttgart-Weilimdorf und, nach Auflösung unserer Schule infolge Kriegseinwirkungen, von 1944 bis 1945 in Dettenschwang, Kreis Landsberg am Lech. Von Mai 1945 bis Februar 1954 besuchte ich das Realgymnasium in Korntal bei Stuttgart und schloß dort meine Schulausbildung mit dem Abitur ab. Im Mai 1954 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Tiermedizin. Im Sommersemester 1957 studierte ich in Wien. Im Wintersemester 1957/58 setzte ich mein Studium in München fort, wo ich im Wintersemester 1959 das tierärztliche Examen ablegte. Vom 1. April bis 30. Juni 1959 war ich als Praktikant an der Medizinischen Tierklinik der Universität München, unter der Leitung von Professor Dr. K. Ullrich, tätig.

